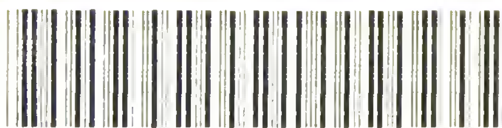
TASCHENBUCH
DER MIKROSKOPISCHEN TECHNIK DER PROTISTENUNTERSUCHUNG

VON DR. S. v. PROWAZEK



C. M. Wenyon.
March 09.

Taschenbuch

der mikroskopischen Technik

der

Protistenuntersuchung

von

Dr. S. von Prowazek.



Leipzig
Verlag von Johann Ambrosius Barth
1907.

16750

Druck von C. Grumbach in Leipzig.

Vorwort.

Das vorliegende Taschenbuch ist in erster Linie für den Mediziner bestimmt. Daher fanden bei der Zusammenstellung der technischen Hilfsmittel zunächst die pathogenen Protozoen Berücksichtigung, ohne daß dabei die anderen Protozoen vernachlässigt worden sind. Bezüglich der freilebenden Protisten gelten zumeist dieselben Vorschriften, die in der allgemeinen Zytologie üblich sind und die in dem Buche „Grundzüge der mikroskopischen Technik für Zoologen und Anatomen“ von Lee und Mayer in vortrefflicher Weise behandelt werden; das Buch fehlt wohl auf keinem zoologischen Arbeitstisch. Wo die technischen Angaben nicht ausführlich und genau genug angeführt worden sind, dürfte diese Unterlassung nicht in allen Fällen dem Autor zur Last gelegt werden, vielmehr sind die Angaben oft in den verschiedenen Publikationen nur unvollkommen enthalten und wurden so wenigstens in ihrer fragmentarischen Form, soweit sie wichtig zu sein schienen, benutzt.

Batavia-Pegansaan, Oktober 1906.

Der Verfasser.

Inhalt.

Seite

Die mikroskopische Untersuchung im allgemeinen.

Bei der Untersuchung der Protozoen kommt es nicht so sehr auf eine Anwendung von komplizierten Färbe- und Untersuchungsmethoden als auf eine zweckmäßige Ausnutzung der optischen Instrumente (Irisblende, Kondensor usw.) an. In erster Linie muß man stets sehr eingehend das lebende Objekt untersuchen. Erst, wenn dieses nach allen Richtungen hin geschehen ist, möge man an die Betrachtung des toten, gefärbten Objektes herantreten.

Für die Untersuchung empfiehlt sich die Anschaffung eines Mikroskopes (großes Stativ) von Zeiß mit den Apochromaten 2 mm (Apert. 1,30) homog. Immersion, Apochromat 3 mm (Apert. 0,95), Apochromat 8 mm (Apert. 0,65), Apochromat 16 mm (Apert. 0,30) und mit den Kompensationsokularen 4, 6, 8, 12, 18.

Als Objektive sind für die Betrachtung der Protozoenpräparate zunächst in der Mehrzahl der Fälle das schwache Objektiv Apochromat 8 mm, dann das Immersionsobjektiv 2 mm (homog. Immersion) von besonderer Wichtigkeit. Gute Dienste leistet aber auch das mit einer Deckglaskorrektur versehene, starke Trockensystem Apochromat 3 mm (Apert. 0,95).

Bei der Immersionslinse bringt man zwischen die Frontlinse und das Deckglas einen kleinen Tropfen Zedernöl („homogene Immersion“), wodurch eine Brechung der Strahlen an der unteren Linsenfläche vom Einfallslot vermieden wird und die Lichtstrahlen, die

sonst beim Übergang aus dem Deckglas in die Luft gebrochen und unausgenützt bleiben würden, in das Objektiv insgesamt einzudringen vermögen. Im Gegensatz zu den Trockensystemen erreichen wir auf diese Weise einen Strahlenkegel mit einem größeren Öffnungswinkel. Bei der Einstellung des Immersionssystems bringt man zunächst durch Senken des Tubus die Linse mit der Kuppe des Zedernöltropfens in Kontakt und versucht durch vorsichtige Handhabung des Triebrades ein eben noch sichtbares, verschwommen angedeutetes Bild von dem betreffenden Präparat zu erhalten. Die feinere Einstellung wird durch die Mikrometerschraube besorgt. Nach der Untersuchung entfernt man sehr vorsichtig mit einem, mit Benzin getränkten, weichen Lappen (am besten altes, gewaschenes Battisttuch) den Öltropfen vom Objektiv. Vom Deckglas wird das Öl durch leichtes Streichen mit einem in Benzin getauchten Pinsel beseitigt. Diese Prozedur muß mit einiger Vorsicht geschehen, da sonst der durch eingedicktes Zedernöl befestigte Deckglasausstrich verschoben wird und sodann eventuelle Kreuztischnotizen unbrauchbar werden.

Von besonderer Wichtigkeit ist der Beleuchtungsapparat nach Abbé, der aus einem Spiegel, einer Irisblende und einem aus einem Linsensystem gebildeten Kondensor besteht. Als Spiegel dient ein Plan- oder Hohlspiegel. Da die meisten Strahlen im Objekt zur Vereinigung kommen, sofern sie die Kondensorlinse parallel treffen, so ist besonders bei den Immersionssystemen ein Planspiegel anzuwenden. Der Hohlspiegel liefert viele konvergente Strahlen, er tritt nur bei größerer Nähe der Lichtquelle in Dienst. — Wenn man bei Tageslicht mikroskopiert, ist es zweckmäßig, das Licht von einer weißen Wolke oder von einer entsprechend montierten Mattscheibe aufzufangen. Um das andere Auge (falls es angängig

ist, soll man mit dem linken Auge mikroskopieren) möglichst zu schonen, ist eine Abblendung des übrigen Lichtes durch eine große, passend angebrachte, schwarze Papptafel anzuraten. Auch kann man durch Einklemmen einer monokelartigen, schwarzen Korkscheibe o. e. ä. in das andere Auge denselben Zweck erreichen.

Bei Anwendung von künstlichem Licht pflegt man zwischen Mikroskop und Lampe eine mit Wasser oder noch zweckmäßiger mit blauer, ammoniakalischer Kupfersulfatlösung gefüllte Schusterkugel anzubringen, die das Licht konzentriert. Dem Tageslicht nahe kommt in bezug auf die Lichtstärke die Koch-Wolzsche Mikroskopierlampe, mit Zirkonleuchtkörper (nach Schiefferdecker). Auch eine Auerlampe ist zu empfehlen.

Der Kondensor selbst wird durch ein Linsensystem gebildet, dessen Brennpunkt für parallele Strahlen (Planspiegel) nahe der Objektebene liegt, so daß zu dem Objektiv ein Strahlenkegel mit einem großen Öffnungswinkel kommt. Aus dem hier angedeuteten Grunde muß wegen der verschiedenen Entfernungen der künstlichen Lichtquellen der Beleuchtungsapparat in der Richtung der optischen Achse nach unten oder oben durch Triebschrauben verschiebbar eingerichtet sein.

Durch Verschiedenheiten im Lichtbrechungsvermögen der einzelnen Teile des Protoplasmas im weitesten Sinne des Wortes entsteht durch Diffraktion der durchgehenden Strahlen das sogen. Strukturbild des mikroskopischen Präparates, das gewissermaßen nur aus Linien und verschieden abgestuften Schatten besteht und für dessen Zustandekommen die maximale Beleuchtung überflüssig ist. In diesem Falle pflegt man den Kondensor auszuschalten und bedient sich der Blenden allein. Anders verhält sich dies bei dem Farbenbild, das durch Absorption der durchgehenden Strahlen im

Präparat entsteht, und für das eine maximale Beleuchtung nötig ist; — es muß ein möglichst weiter Beleuchtungskegel erzielt werden, daher wird der Beleuchtungsapparat eingeschaltet.

Für das Studium der Protozoen ist eine richtige Ausnutzung des Kondensors, der Blenden sowie der Mikrometerschraube eine unerläßliche Vorbedingung. Hierfür gibt es aber keine besonderen Vorschriften, sondern man muß sich dieses durch eine längere Übung aneignen.

Sehr gute Dienste leistet beim Zeichnen der mikroskopischen Präparate der sogenannte Zeichenapparat, bei dem durch Brechung und Reflexion durch Spiegel und Prismen gleichzeitig das Bild des Zeichenpapiers, das auf einem Zeichentisch oder Zeichenkasten in der Höhe des Objekttisches des Mikroskopes angebracht ist, und des Objektes sichtbar gemacht wird. Man braucht dann bloß mit einem harten, scharf gespitzten Bleistift die Konturen des sichtbaren Objektes nachzuzeichnen. Zu empfehlen ist der Abbé'sche Zeichenapparat.

Für die Durchmusterung einer größeren Anzahl von Präparaten (Malaria) ist ein beweglicher Objekttisch nötig. Durch zwei bewegliche, zueinander senkrecht stehende Schlitten, die längs einer Nonusskala laufen, kann das Präparat genau durchgesehen. jede einzelne Stelle scharf eingestellt und durch die Nonienindices bezeichnet werden.

Von weiteren Hilfsapparaten ist für das Präparieren feiner Objekte, wie Insekten (Mücken, Fliegen usw.), Arachnoideen (Zecken), eine binokuläre Lupe von Zeiß empfehlenswert. Gute Dienste leistet ein heizbarer Objekttisch für Untersuchungen der lebenden Malariaplasmodien und Dysenterieamöben.

Ein Polarisationsapparat ist nötig für die Untersuchung der doppeltbrechenden Eigenschaften des

Malariaplasmodienpigmentes, verschiedener Einschlüsse und apoplasmatischer Strukturen des Protistenzelleibes. Zum Messen der Objekte wird ein Okularmikrometer benutzt.

Bei der Untersuchung lebender Objekte leistet die Methode des hängenden Tropfens gute Dienste. Die fraglichen Lebewesen werden mittels einer Kapillarröhre in einem kleinen Tropfen auf die Mitte eines reinen, entfetteten Deckglases gebracht und das derart beschickte Präparat mittels einer Ehrlichschen Pincette umgekehrt über die eingeschliffene Mulde eines hohlen Objektträgers mit einem luftabschließenden Medium wie Vaseline festgekittet. Der Abschluß dieser feuchten Kammer muß möglichst dicht und genau sein. Bei der Untersuchung benutzt man eine enge Blende und ist bemüht, ein Strukturbild zu gewinnen. Nach dem angedeuteten Prinzip ist Schulze's feuchte Kammer gebaut, nur daß die Mulde des Objektträgers noch von einem eingeschnittenen rinnenförmigen Ring umgeben ist, der zur Aufnahme von Wasser dient. In manchen Fällen kann man in dieses Wasser noch kleine Grünalgen, wie Spirogyra, hineinbringen, die dann im Lichte O abspalten und so die Sauerstoffspannung in der feuchten Kammer regulieren.

Die Dicke der in Verwendung stehenden Deckgläschen darf im allgemeinen nicht 0,16 mm überschreiten. Für Blutausstriche verwendet man die dünnen Blutdeckgläschen.

Die tingierten Deckglaspräparate werden meist mit Canadabalsam, die nach Giemsa-Romanowsky gefärbten Deckglaspräparate mit eingedicktem Zedernöl (nach Koch und Schaudinn) an die gut gereinigten Objektträger festgekittet.

Von anderen Instrumenten stehen im Gebrauch: Präpariernadeln und -lanzetten, Scheren, Skalpelle, Ehrlich- und Cornetsche Pinzetten, die selbsttätig die

Deckgläschen festhalten (für die Löfflersche Geißelfärbung zu empfehlen) u. a. m. Die Objektträger werden am zweckmäßigsten mittels eines Schreibdiamanten signiert.

Zum Zeichnen der Präparate bedient man sich des Bristolzeichenpapiers, japanischer Pinsel und verschieden harter, scharf gespitzter Bleistifte.

Sogenannte Vitalfarbstoffe.

Bei der Untersuchung der lebenden Objekte leisten die sogen. Vitalfarbstoffe in verschiedenen hohen Verdünnungen (meist in physiologischer Kochsalzlösung) häufig sehr gute Dienste. Unter der großen Menge der bis jetzt erprobten Vitalfarbstoffe wären folgende zu empfehlen:

I. Bismarckbraun (Brandt, Arch. f. Anat. und Phys. Phys. Abt. 1878, S. 563). Brandt empfiehlt eine Lösung von 1:3000 (Biolog. Zentralbl. Bd. 1, 1881, S. 202). Es färbt oft das Protoplasma gelblich, vor allem aber verschiedene Granulationen rotbraun.

II. Methylenblau rectific. (Methylenblau B. X. wird weniger gut vertragen).

III. Das von Ehrlich, Ascoli und Levaditi (Journal de Physiologie et de Pathologie générale No. 3, 1901) eingeführte Oxazin Brillantkresylblau. Es färbt manche Granulationen metachromatisch (violett und blau). In manchen Fällen nimmt in der absterbenden Zelle das Karyosom sehr deutlich den Farbstoff an, weshalb es besonders bei Trypanosomenuntersuchungen zu empfehlen ist.

IV. Für die vitale Färbung ist ein sehr geeigneter Farbstoff das zur Gruppe der Eurhodine gehörige Neutralrot, das Ehrlich zuerst in die histologische Technik einführte. Seine Eigenschaften sind in der

Folgezeit mehrfach studiert worden (Mayer, Sitzungsber. d. naturw. med. Vereines Lotos 1896; Prowazek, Zeitschrift f. wiss. Zool. Bd. 83, 1897; Fischel, Untersuch. ü. d. vitale Färbung, Anatom. Hefte Heft 52/53, 1901; Plato, Berl. klinische Wochenschrift 1899 usw. und Arch. f. mikroskop. Anatomie Bd. 56, Heft 4).

Es ist ein von Witt entdeckter sogenannter küpenbildender Farbstoff, der in die Zelle auf osmotischem Wege aufgenommen und hier am Orte seiner elektiven Speicherung in eine gefärbte Oxyform übergeführt wird, die je nach dem Farbenton sogar die Alkali- und Säureverteilung im Protoplasma bis zu einem gewissen Grade anzeigt (gelbrot = alkalisch, kirschrot = sauer).

Unter dem Einfluß der intramortalen Reduktionen entfärben sich die tingierten Einschlüsse. Es kann jedoch später wieder eine Färbung (Paramaecium) eintreten.

Mit dem Farbstoff färben sich in vielen Protistenzellen die Kerne und können im gefärbten Zustande sogar den ganzen Teilungsprozeß durchlaufen (dieses wurde für Pflanzen von Douglas Campbell, für Metazoen [Amphibienlarven] von mir, für Opalina ranarum und Nyctotherus cordiformis von Przesmycki nachgewiesen). Nach Przesmycki (Sitzungsberichte der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in München 1899, Heft I) färben sich die verschiedenen Bestandteile des lebenden Kernes (Chromatin und Achromatin) verschieden. Besonders gut nehmen die Kerne der parasitischen, auf eine geringe O-Spannung abgestimmten Infusorien den Farbstoff an. Bei parasitischen Flagellaten tingieren sich auf verschiedenen Entwicklungsstadien die Innenkörper der Kerne (Karyosome bei Trichomastix und Trichomonas).

Außerdem färben sich verschiedene Granulationen, die zu der Verdauung und Assimilation in naher Beziehung stehen und zum Teile Fermentträger sind. In dieser Hinsicht sei besonders auf die auch tech-

nisch interessante Arbeit von Nierenstein hingewiesen (Zeitschrift für allgemeine Physiologie, herausgegeben von Verworn 1905).

Ferner kann man mit dem Farbstoff apoplasmatische Strukturen, die mit Myelinen und Paramyelinen verwandt sind (Kölsch), zur Darstellung bringen. Bei manchen Infusorien färbt sich regionär das zuweilen lokomotorisch stark beanspruchte Protoplasma.

Mit dem Farbstoff kann man ferner alle Etappen der Verdauung in den sogenannten Nahrungsvakuolen der Ciliaten (Prowazek, Nierenstein) verfolgen. Wendet man den Farbstoff in höherer Konzentration an, so ist man in der Lage, den Nachweis zu erbringen, daß die kontraktilen Vakuolen (Paramaecium) auf gewissen Stadien alkalisch (gelbrot) reagieren.

Trotzdem ist das Neutralrot für die Protistenzellen kein absolut indifferenter Körper. Nach Heinz (Handbuch der experimentellen Pathologie und Pharmakologie) ist es in Verdünnungen von 1:800 oder 1:1000 für Paramäcien giftig. — Man setzt am besten mit einer engen Öse einen kleinen Tropfen der sehr verdünnten, nicht zu alten Neutralrotlösung zu dem Deckglaspräparat hinzu oder läßt einen gleichen Tropfen auf dem Objektträger eintrocknen und setzt später den Tropfen mit den Infusorien dazu.

V. Dem Neutralrot ähnlich ist das Neutralviolett, nur daß es in stärkeren Lösungen noch giftiger als Neutralrot ist.

VI. Rasch färbt das Nilblausulfat und Nilblauchlorhydrat.

VII. Für vitale Kernfärbungen empfiehlt schließlich Przesmycki Auramin (1:2000).

Von anderen Vitalfarbstoffen sei hier noch Dahlia (Certes), verdünnte wässerige Hämatoxylinlösung (Brandt), Bleu de quinoléine und Cyanin (Certes, Zool. Anz. Bd. IV, 1881, Nr. 81 u. 84) genannt.

Der letztgenannte Autor löst die Farbstoffe (Chinolinblau 1:500000) in Infusorienwasser und wendet sie ganz schwach an.

Bezüglich der Vitalfärbung seien hier noch einige Bemerkungen aus der Arbeit von Fischel (Anatom. Hefte 1901) zitiert: „Das lebende Gewebe nimmt nur basische Farbstoffe auf, saure dagegen nicht, und zwar solche basische Farbstoffe, welche entweder den einfachen Ammoniakrest NH_2 enthalten oder einen solchen, in welchem der Wasserstoff durch ein der fetten Reihe angehöriges Alkoholradikal (Methyl, CH_3, oder Äthyl, C_2H_5) vertreten ist.“ „Die Ursache der Giftigkeit läßt sich aus der chemischen Konstitution nicht ermitteln.“ „Die Reaktion der Zellen spricht entschieden dafür, daß hier eine Färbung eines lebendigen Bestandteiles des Zellkörpers vorliegt“, dagegen weiter: „Nicht alles, was sich in der lebenden Zelle färben läßt, braucht übrigens, wie schon die Tinktion der Pigmentkörnchen zeigt, lebendem Protoplasma anzugehören.“ —

In manchen Fällen werden die lebenden beweglichen Protisten in farbigen Medien beobachtet. Für das Studium der Gregarinenbewegung (Schewiakoff) ist die Anwendung von verschiedenen Tuschelösungen zu empfehlen. Certes (Bull. soc. Zool. France 13, Vol. 1888, p. 230) wendet eine Lösung von Anilinschwarz Fabre-Domergue eine konzentrierte Lösung von Diphenylaminblau an (Ann. Microgr. Paris Tome 2, 1889, p. 545).

Stark bewegliche Objekte werden durch zähflüssige Medien (Gummi, Gelatine) in ihrer Beweglichkeit behindert und einer bequemeren Beobachtung zugänglich gemacht. Bei Infusorien mit pulsierenden Vakuolen kann man auf diese Weise die Entleerung der Vakuole studieren und den entleerten Flüssigkeitstropfen sogar neben dem Organismus eine Zeitlang beobachten (Römer).

Darstellung der Kernsubstanzen.

Von besonderer Wichtigkeit für das Studium der Protistenzelle ist die Darstellung der Kernsubstanzen, in erster Linie der sogenannten Chromatine, die bei diesen Zellen oft nicht einmal an einen morphologisch definierbaren Kern gebunden sind, sondern in Form von sogenannten Chromidien in der Zelle selbst zerstreut vorkommen (Hertwig, Schaudinn). Da das Wesen der histologisch-zytologischen Färbung derzeit noch ziemlich unbekannt ist und wir in diesem Sinne kein ausschließliches Kriterium für den Nachweis der Kernsubstanzen besitzen, sind wir in erster Linie darauf angewiesen, den entwicklungsgeschichtlich-morphologischen Weg zu beschreiten und entweder auf diese Weise das Entstehen jener Substanzen aus einem wohl charakterisierten Kern darzulegen oder die Ausbildung eines richtigen Kernes aus den oben erwähnten Chromidialmassen nachzuweisen. Nebenbei kann man sich zum Nachweis der Chromatine folgender Methoden bedienen (vgl. Carnoy, Biol. Cellulaire p. 208):

Das Chromatin löst sich in konzentrierten Mineralsäuren, in verdünnten Alkalien, in Kaliumkarbonat und Natriumphosphat. In 10proz. Kochsalzlösung wird es gallertig und löst sich manchmal auf. Für die Lösung der erwähnten Substanzen, sofern man nur frische Zellen zur Verfügung hat, eignet sich 1proz. Kalilauge, Kaliumkarbonat (40—50 Proz.) und rauchende Salzsäure. Gar nicht oder nur teilweise anverdaut werden die Chromatine durch Pepsin und Trypsin. (Zur Darstellung des Periplasts der Trypanosomen zu empfehlen.) Nach Beale löst man den getrockneten pulverisierten Saft aus den Magendrüsen des Schweines in destilliertem Wasser, filtriert und behandelt damit die Objekte unter dem Deckgläschen bei 37° C bis zu

mehreren Stunden. Kuskow (Arch. f. mikr. Anat. 30, Bd. 1887, S. 32) löst 1 Teil Pepsin in 200 Teilen einer 3prozentigen Oxalsäurelösung und behandelt damit die Zellen.

Das Chromatin wird ferner nicht in Saponin und Sapotoxin gelöst, dagegen ziemlich verändert in taurocholsaurem Natrium (1:20 in physiolog. Kochsalzlösung in braunen Flaschen), das das Protoplasma der Protozoen: Flagellaten, Spirochäten, im Gegensatz zu den Bakterien und Pilzen, mit Ausnahme der Pneumokokken, löst.

Über weitere diesbezügliche Fragen sei auf das Buch von Zimmermann, Morphologie und Physiologie des pflanzlichen Zellkernes, Jena, 1896, verwiesen.

Als Reagens auf Chromatin wird Methylgrünessigsäure (wässerige starke Lösung mit Zusatz von 1proz. Essigsäure) empfohlen, doch fällt oft die Färbung schwach aus, und manchmal bleibt die Reaktion dieses basischen Farbstoffes, der „mit einem Scheine von Berechtigung“ ein Kernfarbstoff ist (Fischer, Fixierung und Färbung des Protoplasmas, Jena, S. 192), ganz aus. Gegen diese Reaktion sprachen sich auch bereits Galeotti und Neeresheimer aus.

Das Plastin (Nukleolensubstanzen, Karyosome) ist meistens stärker lichtbrechend, färbt sich mit Heidenhains Eisenhämatoxylin tief schwarz, nach der Giemsa-Romanowsky-Methode, sofern es rein auftritt, wie in den Metazoennukleolen oder auf manchen Stadien der Karyosomentwicklung bei den Trypanosomen (gepreßte ♀-Formen, Stadien aus den Kulturen), blau, wird aber in den meisten Fällen von dem roten Chromatin derart maskiert, daß sich die fraglichen Gebilde zumeist rotviolett färben. Mit Methylgrünessigsäure nimmt es keine Färbung an.

List (Mitt. Zool. Neapel, 12. Bd., 1896) stellt die Kernkörper mit Berlinerblau dar; zu dem mit Sublimat

fixierten Material (meist Schnitte) setzt man zwei Tropfen von 1½proz. gelben Blutlaugensalz, nach fünf Minuten gießt man ab und setzt ein bis zwei Tropfen 1proz. Salzsäure zu — es bildet sich Berlinerblau, das in den von List untersuchten Zellen den Nebennucleolus färbte. Zuweilen ist es angezeigt, dem Objekt Eisen einzuverleiben, indem es auf eine halbe Stunde in Eisenchlorid (10 Tropfen einer Lösung von ½ g Eisenchlorid auf 100 g Wasser gemischt mit 5—15 Tropfen 1proz. Salzsäure und 50 g Wasser) gebracht wird.

I. Stamm. Plasmodroma.

I. Klasse. Rhizopoda.

I. Ordnung. Amöbina.

Amöben untersucht man zunächst frisch im Deckglaspräparat, das mit Wachsfüßchen versehen und gegen das Verdunsten der Untersuchungsflüssigkeit mit einem Wachs- oder Vaselinerand umrandet worden ist. Den Wachsrand stellt man sich am besten in der Weise her, daß man mit einem kurz vorher angebrannten, mit einem kurzen Docht versehenen Wachsstock rasch den Rand des Deckglaspräparates entlang fährt. Die amöboiden Bewegungen kann man mechanisch durch einen Zusatz von Kirschgummilösung verlangsamen (Eismond, Zool. Anz., 13. Jahrg., 1890).

Reinkulturen von Amöben im Sinne der Bakteriologen sind bis jetzt nicht gelungen. Man kann sie höchstens in Gemeinschaft von Bakterien „züchten“: dieses ist in verdünnter Bouillon und in dünnen Stroh- und Heuinfusen gelungen. Celli und Fiocca „züchteten“ Amöben in einer 5proz. genau alkalisierten Lösung von Fucus crispus in Wasser oder Bouillon. Auf diese Weise kann man meist Myxoamöben und Strohinfus-

amöben halten. Schardinger züchtete Amöben in einem wässrigen Heuaufguß, dem 1—1½proz. Agar hinzugefügt worden war.

Vielfach wird folgender Nährboden verwendet: 30—40 g Heu werden in 1 Liter Wasser aufgekocht, sodann filtriert und dem Filtrat 1—1½ proz. Agar zugesetzt, dieses durch Kochen aufgelöst. Dann alkalisiert man durch kohlensaures Natrium und füllt ohne Filtration in Probiergläschen ab. Es bildet sich ein Niederschlag, den man jedoch leicht zum Absinken bringen kann. Ausgedehnte Züchtungsversuche hat Vahlkampf angestellt.

„Die Zahl der zur Züchtung geeigneten Kulturböden ist ziemlich groß, und man kann sagen, daß bis auf wenige Ausnahmen fast alle zur Verwendung gelangten Substrate tauglich waren.“ Im allgemeinen ist ein neutrales bis schwach alkalisches Medium das geeignetste. Reinkulturen (ohne Bakterien) sind nicht ausführbar. Besonders sind feste Nährböden zu empfehlen, und zwar: 1. Nährstoff Heyden 1—2,0, Agar 1,5 und Leitungswasser 100,0. 2. Nutrose 1—2,0, Agar 1,5, Leitungswasser 100,0. 3. Somatose 1—2,0, Agar 1,5, Leitungswasser 100,0. 4. Pepton Witte 1—2,0, Agar 1,5, Leitungswasser 100,0. 5. Agar 1,5, Leitungswasser 100,0. 6. Dieselben Nährböden mit Strohdekokt, welcher bis zur Weißweinfarbe verdünnt war, an Stelle des Leitungswassers. 7. Fucus crispus 5,0 und Leitungswasser 100,0. 8. Stärkekleister von der Konsistenz des Agars. Die Nährböden müssen einen hohen Wassergehalt besitzen. Am geeignetsten ist nach Vahlkampf für die Züchtung der Amoeba limax Fucus crispus und Heyden-Agar. Vielfach wurden jedoch statt der echten Amöben nur Myxamöben gezüchtet (nicht ausschlaggebende Kriterien dieser: leichte Cystenbildung, häufige Flagellatenzustände, Plasmodienbildung, Aufwärtskriechen der Amöben an dem Substrat).

Alles nähere vgl. Frosch, Zur Frage der Reinzüchtung der Amöben, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 21, 1897, S. 927, sowie Casagrandi und Barbagallo, Über die Kultur von Amöben, Zentralbl. f. Bakteriologie Bd. 21, 1897, S. 579—589; Beyrinck, Zentralbl. f. Bakteriologie u. Parasit., Jena 1896, Bd. 19 u. 1898, Bd. 21. Schardinger, Zentralbl. f. Bakteriologie Bd. 19 u. 22; E. Vahlkampf, Archiv f. Protistenkunde Bd. 5, 1905.

Größere Amöben muß man, um sie im Stadium ihrer amöboiden Bewegung bei der Fixierung zu erhalten, entweder rasch mit dem betreffenden Fixierungsmittel unter dem Deckglas überraschen oder sie vorher betäuben. Für Lähmungszwecke wird von Schürmayer (Jena, Zeitschrift f. Naturw., 24. Bd., 1890, S. 402) eine Lösung von 1:10000 Strychninnitrat empfohlen. Auch Antipyrin in einer Lösung von 1:1000 und Kokain 1:10000 sind angewendet worden.

Freilebende Amöben sind nach verschiedenen Methoden fixiert worden und es seien an dieser Stelle nur einige erwähnt:

a) Braß (Zeitschr. f. wiss. Mikroskop. 1. Bd., 1884, S. 39) läßt unter das Deckglas eine Lösung von:

1 Teil Chromsäure,
1 „ Essigsäure (konz.),
1 „ Platinchlorid,

und 400—1000 Teile Wasser zutreten, wäscht aus und färbt die Amöben nach verschiedenen Methoden.

b) Korschelt (Zool. Anz. 5. Jahrg., 1882, S. 217) fixiert mit 2proz. Chromsäure.

c) Landsberg bringt die Amöben mit einer feinen Pipette direkt in etwa 1proz. Osmiumsäure.

d) Zograff (Compt. rend. acad. soc. Paris. Tome 124, 1897, p. 245) bringt die Amöben auf zwei bis vier Minuten in $^1/_4$—$^1/_5$proz. Osmiumsäure, dann auf

fünf bis zehn Minuten in Holzessig (1 Teil auf 8 bis 10 Teile Wasser), dann in Wasser und Alkohol.

e) Zimmermann bediente sich einer Lösung von

0,5 g Chromsäure,
0,25 „ Sublimat,
100 „ Wasser,

von dieser Stammlösung nahm er 5 ccm, setzte zwei bis drei Tropfen 5proz. Essigsäure oder zwei Tropfen 10proz. Platinchloridlösung hinzu, und ließ dann etwas davon unter das Deckglas hinzutreten.

Zu empfehlen sind auch Pikrinsäuregemische, die die Manipulation insofern vereinfachen, als man gleich im 70proz. Alkohol ohne Intermedien auswaschen kann. Aus eben demselben Grunde sind aber hernach Farben in alkoholischen Flüssigkeiten (Parakarmin, Boraxkarmin, Hämakalzium) oder Hämalaun und Karmalaun anzuwenden. Gute Resultate erhält man mit Pikrinessigsäure (3 Teile einer konzentrierten Lösung von Pikrinsäure und 1 Teil Eisessig). Auswaschen in 70 % Alkohol.

Gute Dienste leisten ferner Sublimatgemische (2/3 wässerige concent. Sublimatlösung, 1/3 Alkohol 90 %) und das Flemmingsche Gemisch (25 Teile von 1proz. Chromsäure, 10 Teile 1proz. Essigsäure, 10 Teile 1proz. Osmiumsäure und 55 Teile Wasser), nur daß man im letzteren Falle nicht mit allen Farben färben kann. Vielfach wird in diesem Falle Safranin oder Gentianaviolett, Orange-G. empfohlen. Färben kann man ferner mit Alaunkarmin, Boraxkarmin, Pikrokarmin und verdünntem Grenacher's Hämatoxylin (Kontrolle unter dem Mikroskop, kurzes Auswaschen in Brunnenwasser).

Schaudinn (Anh. Abh. Akad., Berlin 1899, S. 9) fixiert Trichosphaerium mit 1proz. Osmiumsäure oder mit einem Gemisch von einem Teil wässerigem Subli-

mat und zwei Teilen absolutem Alkohol, die Kerne werden mit einer 43proz. alkoholischen Alaunkarminlösung gefärbt. Das Färben und Auswaschen geschieht bis zum Einbetten in Zentrifugierröhrchen. Vahlkampf fixierte Amöben mit Erfolg in der Zenkerschen Flüssigkeit (Aqu. dest. 100,0, Sublimat 5,0, Natr. sulf. 1,0, Kal. bichrom. 5,0, Eisessig 5,0).

Bei allen Manipulationen, Färbungen usw. ist stets streng darauf zu achten, daß die Objekte in einem flüssigen Medium verbleiben, weil sie sonst bis zur Unkenntlichkeit schrumpfen oder zerfließen, so daß vielfach nur der Kern übrig bleibt. Daher ist im allgemeinen die Methode des trockenen Deckglasausstriches nicht zu empfehlen.

Sind Amöben in großer Menge vorhanden, so konserviert man sie direkt mit Sublimatgemischen (vgl. oben) oder mit dem Flemmingschen Gemisch in Zentrifugierröhrchen, zentrifugiert sie ab, wäscht im destillierten Wasser aus, färbt mit Alaunkarmin, Boraxkarmin usw. vor und bringt die Objekte nach jedesmaligem Abzentrifugieren in dem Röhrchen bis ins Chloroform und Chloroformparaffin, überträgt sie mit einer sauberen Pipette in eine kleine Mulde von hartem Paraffin, das in einem peinlichst mit salzsauerem Alkohol gereinigten Uhrschälchen zum Erstarren gebracht wurde. Dann bringt man das Ganze in den Thermostaten, läßt das Chloroform abdampfen und zerlegt nach dem raschen Erstarren des Paraffins die Amöben in dünne Schnitte.

Hernach kann man die Schnitte noch mit Heidenhains Eisenhämatoxylin färben. (Man läßt die Schnitte höchstens sechs Stunden lang in einer $2^1/_2$proz. wässerigen Eisenalaunlösung [violette Kristalle von schwefelsaurem Eisenoxyd-Ammoniak], wäscht mit destilliertem Wasser ab und bringt sie in eine alte, oft gebrauchte Hämatoxylinlösung [1 g Hämatoxilin. 10 ccm

90proz. Alkohol, 90 ccm Wasser], differenziert in der oben genannten Eisenalaunlösung unter steter Kontrolle unter dem Mikroskop, bis das Plasma ganz hell ist und die Kerne ein schwarzes Chromatingerüst zur Schau tragen, spült gründlich im Brunnenwasser ab, Alkoholreihe, Xylol, Kanadabalsam.)

Dysenterieamöben

untersucht man zunächst im lebenden Zustande, indem man mit einer Pinzette etwas von dem blutigen Schleim unter das Deckgläschen bringt. Es empfiehlt sich nicht mit physiologischer Kochsalzlösung zu verdünnen. Man muß ferner physikalische (Druck) und chemische Schädlichkeiten vermeiden. In manchen Fällen ist die Anwendung eines heizbaren Objekttisches von Nutzen. Für vitale Färbungen ist Methylenblau (1:20000 usw.) sowie Neutralrot (Entamoeba buccalis) anzuraten.

Für Dauerpräparate hat sich folgende Methode als die zweckmäßigste erwiesen:

Man streicht den Schleim möglichst dünn auf gut gereinigte Deckgläschen aus und läßt ihn rasch, ohne daß er eintrocknet, mittels einer Ehrlichschen Pinzette auf das folgende heiße, noch rauchende Gemisch mit der bestrichenen Seite nach unten auffallen:

konzentrierte wässerige Sublimatlösung 100 ccm,
absolut. Alkohol 50 ccm,
Eisessig 5 Teile,

oder noch einfacher:

$^2/_3$ konzentrierte Sublimatlösung + $^1/_3$ 90 % oder absolut. Alkohol.

Nach höchstens $^1/_4$ Stunde wäscht man in Wasser, dann 60proz. Jodjodalkohol (leicht gelb), das Sublimat aus und färbt je nach Bedarf (Kern, Chromidien!) in einer verdünnten Lösung (Rotweinfarbe) von Gre-

nacher's Hämatoxylin, wäscht im Brunnenwasser, bis kein blauer Farbenton von den Objekten ausgeht, aus, Alkoholreihe, Xyol, Kanadabalsam. Jürgens (Veröffentl. a. d. G. d. Militärsanitätswesens, Heft 20, Berlin 1902) befestigt die möglichst dünnen, feuchten Ausstriche über einer Glaskammer mit 1—2 % Osmiumsäurelösung, durch deren Dämpfe die Amöben abgetötet und in 10—20 Minuten fixiert werden. Bei Anwendung der Schulze'schen Kammer kann man den ganzen Fixierungsvorgang unter dem Mikroskop verfolgen und nach Belieben regulieren. Abspülen in Wasser. Safraninfärbung; durch „ganz dünne Essigsäure“ wird der Innenkörper differenziert.

Jäger färbte die Dysenterieamöben noch mit Eosin nach.

Boas färbte die Amöben mit Vesuvin, vor allem mit Safranin, Amberg tingierte besonders das Entoplasma mit wässeriger Toluidinblaulösung.

Bei der Diagnosestellung achte man auch auf das Vorhandensein von Charcot-Leyden'schen Kristallen.

Für Schnitte fixiere man entweder mit dem erwähnten Sublimatgemisch, mit Chromosmiumessigsäure (Flemming's Lösung) oder mit Zenker'scher Flüssigkeit (man löst 5 g Sublimat und 5 ccm Eisessig in Müller's Gemisch: Kaliumbichromat 2—2½ g, Natriumsulfat 1 g. Aqua. dest. 100 ccm. Fixiert mehrere Stunden, wäscht in Wasser aus, und behandelt die Schnitte mit 60 % Jodalkohol) und färbe mit Hämatoxylin (Eosinnachfärbung), Eisenhämatoxylin, Safranin oder Anilinwasser-Methylviolett. Nach Sublimatalkoholhärtung färbe man mit Toluidinblau wässerig mit einer Differenzierung in Orange G. (zu beziehen nur von Grübler, konzent. wässerige Lösung). Die fertigen Cysten der Entamoeba histolytica lassen sich nicht schneiden und springen vor dem Messer leicht aus (Schaudinn).

Harris härtet in Alkohol oder Sublimat, färbt mit Eosin vor und färbt in schwacher Toluidinblaulösung nach; 3—4 Minuten langes Auswaschen in Alkohol. Bezüglich der Unterscheidungsmerkmale zwischen den verschiedenen parasitischen Amöben des Menschen sei auf Schaudinns „Untersuch. ü. d. Fortpflanzung einiger Rhizopoden", Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 19. Bd., Heft 3, 1903, verwiesen.

2. Ordnung. Foraminifera.

Man fixiert mit Sublimatalkohol ($^2/_3$ ccm wässerige Sublimatlösung + $^1/_3$ 90proz. Alkohol, Auswaschen in 60proz. Jodalkohol) oder mit Perényischer Flüssigkeit (4 Teile 10proz. Salpetersäure, 3 Teile 90proz. Alkohol und 3 Teile $^1/_2$proz. Chromsäurelösung) und färbt mit Grenachers Hämatoxylin, mit Heidenhains Eisenhämatoxylin, Alaunkarmin oder Safranin. Die Schalen werden durch Kalilauge oder Eau de Javelle (Kaliumhypochlorid) aufgelöst.

Schaudinn (Zeitschrift f. wiss. Zoolog. 59. Bd., 1895, S. 193) fixiert Calcituba mit 1proz. Osmiumsäure oder mit einer Mischung von 1 Teil wässerigem Sublimat und 2 Teilen absolutem Alkohol. Um die Befruchtung der Flagellosporen der Polystomella zu studieren, sucht man sich auf gut Glück eine größere Anzahl von Individuen, die mit Chromidien oder teilweise mit Sporenkernen erfüllt sind, aus, zerdrückt sie, saugt das Protoplasma mit einer Kapillare auf und verrührt das Ganze auf dem Deckglas einer feuchten Kammer.

3. Ordnung. Radiolaria.

Lo Bianco konserviert Thalassicolla eine Stunde lang mit $^1/_2$proz. Chromsäure, Acanthometra und Aulacantha mit 50proz. Alkohol oder mit konzentriertem Sublimat oder durch Zusatz von Osmium-

säure zu dem Seewasser. Gefärbt wird mit Hämatoxylin, Pikrokarmin oder Alaunkarmin.

Karawaiew fixiert Aulacantha 24 Stunden in einem Gemisch von gleichen Teilen von Eisessig und Flemmingscher Flüssigkeit (15 Teile 1proz. Chromsäure, 4 Teile 2proz. Osmiumsäure, 1 Teil Eisessig) und härtet mindestens 24 Stunden in dem letzteren Gemisch nach.

Borgert (Zool. Jahrbuch 14. Bd., 1900, S. 207) empfiehlt Sublimatlösung mit Essigsäure (10:2 oder 3) oder Pikrinosmiumplatinchlorid. (200 ccm gesättigte Pikrinsäurelösung + 1 g Platinchlorid in 10 ccm Wasser + 2 ccm Eisessig + 25 ccm 2proz. Osmiumsäure.)

Sphaerozoen werden nach Brandt (Fauna und Flora des Golf von Neapel 1885) mit $^1/_2$—1proz. Chromsäure ($^1/_2$—1 Stunde) oder mit Jodalkohol (70proz. Alkohol, gleiche Menge Seewasser + etwas Jodtinktur $^1/_2$ Std., Auswaschen im Süßwasser, Alkoholreihe) oder mit 5 bis 15proz. Seewassersublimatlösung fixiert.

Bezüglich der Fixierung der Heliozoa gelten die bei den Ciliaten angeführten Vorschriften (Totofärbung mit Alaunkarmin, Pikrokarmin, Beales Karmin. Schnittfärbung: Eisenhämatoxylin.)

II. Klasse. Mastigophora.

Flagellaten im weitesten Sinne des Wortes.

Für freilebende Flagellaten empfiehlt sich nächst der Untersuchung im lebenden Zustande die Konservierung derselben nach der Massenmethode im Zentrifugierröhrchen.

Man fixiert entweder mit Flemming's Gemisch (15 Teile 1 % Chromsäure, 4 Teile 2 % Osmiumsäure, 1 Teil Eisessig) (Steuer, Prowazek) oder mit dem Sublimatalkoholgemisch und färbt mit Grenachers

Hämatoxylin, Alaun-, Boraxkarmin oder nach jedesmaligem Zentrifugieren mit Heidenhains Eisenhämatoxylin (Steuer). Auch kann man sie weiter nach der S. 22 beschriebenen Methode für Schnitte behandeln. Lauterborn (Zeitschr. f. wiss. Zoologie 59. Bd., 1895) fixiert Dinoflagellaten 10 Minuten in Flemmings-Gemisch, 35 % — absolut. Alkohol, beläßt sie dort 24 Stunden, bringt sie langsam ins Wasser, bleicht sie mit 3proz. Wasserstoffhyperoxyd und färbt mit Pikrokarmin oder Delafields Hämatoxylin. Schnitte werden mit Heidenhains Eisenhämatoxylin gefärbt.

Zacharias (Zool. Anzeiger 22. Bd., 1899) fixiert mit 2 Vol. konz. wässeriger Lösung von Borsäure und 3 Vol. konz. wässeriger Lösung von Sublimat.

Für die Färbung der Geißeln ist Löfflers Geißelmethode zu empfehlen (Löffler, Zentralbl. f. Bakt., 6. Bd., 1889, S. 209. Zeitschr. f. wiss. Mikroskop., 6. Bd., 1889, S. 359; 7. Bd., 1890, S. 368; Fischer, Jahrb. Wiss. Bot. 26. Bd., 1894, S. 188).

Als Beize wendet man ein Gemisch von 10 ccm 20 % Tanninlösung + 5 ccm gesättigter Lösung von Ferrosulfat + 1 ccm wässerige oder alkoholische Lösung von Fuchsin oder Methylviolett oder Wollschwarz an.

Das Deckglas mit dem Flagellatenausstrich klemmt man in eine mit rechtwinkligen Backen versehene Cornetsche Pinzette, begießt es mit einem Tropfen der erwähnten Mischung und erwärmt eine Minute lang, bis Dämpfe aufsteigen, wäscht in Wasser ab und färbt in derselben Weise mit einer alkoholischen Fuchsinlösung in Anilinwasser, der bis zu einer leichten Trübung eine 1/10proz. Lösung von Ätznatron zugesetzt worden ist. Die Schwebefällung muß beim Erwärmen über der Spirituslampe verschwinden. Abwaschen, Trocknen mit Filterpapier, Zedernöl.

Parasitische Flagellaten wie Trichomastix, Trichomonas und Bodo fixiert und färbt man am besten

nach der S. 23 beschriebenen Methode (Dysenterieamöben). Besonders die Heidenhainsche Eisenhämatoxylinfärbung ist zu empfehlen. Für die Darstellung der undulierenden Membran bei Trichomonas ist auch die Methode des Deckglasausstriches und Giemsafärbung geeignet.

Trypanosomen.

Die Trypanosomen untersucht man zunächst bei Luftabschluß (Wachsrand, Zedernöl) im Deckglaspräparat, wo sie je nach der Art (am längsten T. lewisi, kurze Zeit Dourinetr.) verschieden lange Zeit am Leben bleiben. Nach Plimmer kann die undulierende Membran der Parasiten gut durch Zusatz von Zitronensäurenatron zu dem Blut, das in einem kleinen Tropfen einer 1 proz. Gelatinelösung etwas eingedickt wurde, verdeutlicht werden. Mit Neutralrot färben sich unterhalb des vegetativen Kernes verschiedene Granulationen. Mit Brillantkresylblau wird das Karysom in dem bläschenförmigen Kern beim Absterben verdeutlicht. Mit Jod färben sich nur manchmal einzelne Granula. Durch Pepsinverdauung stellt man den Periplast dar. Durch taurocholsaures Natrium (1:20, phys. Kochsalzlösung, braune Flasche) werden die Trypanosomen bis auf einen Periplast- und Kernschatten aufgelöst, durch Saponin oder Sapotoxin (Neufeld) wird in erster Linie das Protoplasma in Lösung übergeführt und die Objekte sehen gleichsam eviszeriert aus. Durch Essigsäurezusatz kann der Kern verdeutlicht werden.

Für die Untersuchung der gefärbten Trypanosomen eignet sich die Deckglasausstrichmethode. Es werden die Objekte möglichst dünn auf Blutdeckgläschen oder Objektträger ausgestrichen, lufttrocken gemacht, in 95 proz. oder absoluten Alkohol (15—30 Minuten) fixiert, wiederum getrocknet und dann meist mit Giemsas Gemisch gefärbt.

Die fertige Lösung von Giemsas Eosinazur be-

zieht man von Grübler (Leipzig). Aus einer braunen Tropfflasche läßt man je einen Tropfen des Gemisches zu 1 ccm Wasser (dest.) in einem jedesmal gut gereinigten Meßzylinder zufließen. Nach kräftigem Umschütteln des Gemisches färbt man sodann möglichst bald die Präparate. Nach etwa einer Stunde und mehr wäscht man im destillierten Wasser aus, trocknet und schließt in säurefreiem Kanadabalsam oder in eingedicktem Zedernöl ein.

Laveran behandelt die Präparate nach dem Abspülen eine Minute lang mit 5proz. wässeriger Tanninlösung und spült in Wasser ab.

Zuweilen empfiehlt es sich, 1—10 Tropfen einer 1promill. Kaliumkarbonatlösung den 10 ccm Wasser vor der Herstellung der Färbemischung hinzuzusetzen. Für die Darstellung der undulierenden Membran ist die Fixierung mit Osmiumdämpfen (10 Sekunden) anzuraten. Statt des Methylenazurs, das auch in Giemsas Farbstoff vorkommt, benutzt Ehrlich Dimethyl-Thionin von der Firma Cassella in Frankfurt a. M.

Weitere Färbungsmethoden, mit denen die Trypanosomen dargestellt werden können, werden im Kapitel „Malaria" näher besprochen werden.

Für Schnittfärbungen konservierte Halberstaedter (Zentralbl. für Bakteriologie u. Parasitenk. 38. Bd., 1905) kleine Organstücke der erkrankten Tiere mit konz. wässeriger Sublimatlösung: 12—24 Stunden. 24 Stunden Auswässern in fließendem Wasser, Alkoholreihe, Paraffin, Färben 10 Minuten mit polychromem Methylenblau, Abspülen in Wasser. Einige Sekunden absol. Alk., Xyol, Kanadabalsam. Nach Neporojny und Jakimoff kann man auch mit Safranin und Indigokarmin färben, außerdem kommt man mit einigen Abänderungen auch mit Romanowski- oder Giemsafärbung zum Ziele. (Rasch durch die Alkoholreihe bringen.) Die Überbringung in Alkohol kann man er-

sparen, indem man die Schnitte nach der Färbung und Ausspülung im Wasser in wasserfreies Äzeton (säurefrei!) überführt; Xylol, Kanadabalsam.

Geringe Mengen von Trypanosomen im Blut weist man durch Überimpfung von größeren Blutmassen an empfängliche Tiere nach. Bei der Schlafkrankheit stellt man die Trypanosomen in der Zerebrospinalflüssigkeit durch Zentrifugieren von etwa 5—10 ccm Punktionsflüssigkeit im Bodensatz neben den mononuklearen Leukozyten fest, nachdem die roten Blutkörperchen durch Essigsäure vorher zerstört worden sind.

Die Versuchstiere werden mittels einer sterilisierten Injektionsspritze entweder subkutan oder intraperitoneal mit dem Trypanosomamaterial infiziert. Beim Vorhandensein von geringen Blutmengen ist besonders der letztere Infektionsmodus anzuraten. Die Gerinnung des Blutes wird durch Hirudin, Nat. citricum oder in manchen Fällen bloß durch physiologische Kochsalzlösung hintangehalten.

Kultivierung der Trypanosomen.

Die Trypanosomen sind zuerst von Mc. Neal und Novy im Kondenswasser einer Mischung von Agar und Blut (Kaninchenblut) gezüchtet worden.

Ursprünglich setzten die beiden Autoren für die Kultur von Trypanosoma Lewisi 1 Teil defibrinierten Blutes zu 5 Teilen Agar zu. Später empfahlen sie eine Mischung von 2 Teilen Blut zu 1 Teil Agar als die beste. Nach Nocht und Mayer genügen gleiche Teile Agar und Blut, das Kaninchenblut wird bei den 50° verflüssigten Agarröhrchen zugesetzt und dieselben dann schräg gelegt. Nach dem Erstarren werden sie mit Gummikappen versehen und zum Auspressen des Kondenswassers auf 24 Stunden in einen Thermostaten von 37° gebracht. Mathis (C. R. h. d. B. 1906. No. 36) erhitzte den Nährboden auf 75—100°, ohne nachteilige Folgen bei der

Züchtung zu bemerken. Das Impfblut wird mit der Lühr'schen Spritze aus dem Herzen genommen und mit etwas Kochsalzlösung gemischt. Die erste Impfung geschieht mit einer sterilen Pipette, die weiteren Impfungen mit Ösen (3). Nach höchstens 3 Tagen treten im Kondenswasser die ersten Agglomerationssterne von Trypanosomen auf. Mc. Neal und Novy hielten eine Kultur 306 Tage (bei Zimmertemperatur). (Cult. of Tryp. Lewisi Contribut. t. Med. Research to V. Vaughan Juni 1903.)

Bei 37^0 vermehren sich die Kulturen lebhafter, sterben aber später infolge der Zersetzung des Hämoglobins ab. Die Kultivierung von Tryp. Brucei ist wesentlich schwieriger. Mc. Neal und Novy (D. t. cultivation of Tryp. Brucei, Jour. of Inf. Diseases 1904, vol. 1, p. 1; ferner ibid. 1904, v. 1, p. 517) empfehlen:

Extract von 125 g Rindfleisch in 1000 g Wasser:

Agar . . . . :	20 g,
Pepton . . . :	20 g,
Kochsalz . . :	5 g,
Normal Na_2CO_3:	10 ccm.

Nocht und Meyer nehmen statt 20 g 25 g Agar.

Man mischt je ein Volumen dieses Nährmediums bei 55—60^0 mit der doppelten Menge defibrinierten Kaninchenblutes. Das Optimum für die Kulturen ist 25^0. Trypanosoma evansi wurde von Laveran und Mesnil auf dem genannten Nährboden bis zur zweiten Generation gezüchtet.

Bei der Übertragung der Trypanosomen spielen die Tsetsefliegen eine große Rolle und es seien hier einige bis jetzt bekannte methodologische Andeutungen über die Untersuchung dieser Fliegen gestattet.

Die Glossinen kommen meist im lichten Baum- oder Buschbestand vor und folgen den Flußläufen sowie sumpfigen Ufern der Seengebiete, obzwar sie Sander und

Lommel auch entfernt von Flüssen angetroffen haben. Das Verbreitungsgebiet der Fliegen ändert sich etwas in der Regenzeit. Sie sind an besondere Örtlichkeiten, die sogen. Fliegengürtel (Flybelts) gebunden und sind schattenliebend.

Nach Stuhlmann (Anat. und Physiologie der Tsetsefliege, Pflanzer No. 24, 1905) muß man die Fliegen in der Gefangenschaft jeden 4.—5. Tag füttern, indem man das mit Gaze zugebundene Glas einfach einem Tier (Maultier, Rind usw.) auf die Haut setzt. Die Fliegen untersucht man möglichst frisch in 0,75proz. Kochsalzlösung oder im Blutserum (Ausstrichmethode). Für anatomische Zwecke tötet man sie im heißen Wasser oder heißen, schwachen Alkohol ab (Stuhlmann). Für Schnittserien empfiehlt sich eine Konservierung in der mehrfach erwähnten Sublimatalkoholessigsäuremischung, die natürlich heiß angewendet werden muß. Alkoholreihe, Xyol, Paraffineinbettung. Färbung: Heidenhains Eisenhämatoxylin mit Bordeauxrotnachfärbung (der zweiten Differenzierungsbeize gleich zuzusetzen) oder Romanowsky-Färbung oder nach Halberstädter polychromes Methylenblau (S. 29).

Anhang: Spirochäten.

Die Spirochäten werden im lebenden Zustande nach denselben Methoden wie die Trypanosomen untersucht. Mit Methylenblau färbt sich vital die Hühnerspirochäta und die große Spirochäta balbianii (Perrin). Mit Neutralrot kann man die verschiedenen Verdauungsstadien der von Leukozyten aufgenommenen Spirochäten des Ulcus tropicum sowie der Mundspirochäten verfolgen. Mit Kalilauge und taurocholsauerem Natrium werden die Spirochäten bis auf unbedeutende Schatten gelöst.

Im Deckglasausstrichpräparat werden die Spirochäten nach der Methode von Giemsa (S. 29) gefärbt. Oft ist es vorteilhaft, die Spirochätenausstriche gar

nicht mit absolutem Alkohol zu fixieren, sondern sie sofort ohne Fixierung zu färben. Für die Darstellung der geißelartigen Periplastanhänge (besonders bei Spirochaeta balanitidis) ist die Methode der Löfflerschen Geißelfärbung anzuempfehlen, nur ist vorher eine starke Verdünnung des Untersuchungsmaterials mit physiolog. Kochsalzlösung und eine Anfertigung von recht dünnen Deckglasausstrichen notwendig.

Für größere rigidere Formen empfiehlt sich die nasse Ausstrichfixierung mit heißem Sublimatalkohol ($^2/_3$ konz. Sublimat [wässerig] + $^1/_3$ 90 proz. Alkohol). Vgl. Amöbenfixierung. Nachfärbung entweder mit Heidenhains Eisenhämatoxylin, Grenachers Hämatoxylin und Thionin.

Zettnow (Deutsche med. Wochenschr. No. 10, 32. Jahrgang) hat an der Rekurrenssp. mit Antimonbeize und Äthylaminnachversilberung sogen. „peritriche Begeißelung" sichtbar gemacht. Durch Erwärmen des verdünnten Mundspirochätenmaterials auf 40—50° C und nachträgliche Färbung mit Löffler's Geißelbeize kann man bei der Spirochäta buccalis die Periplastfibrillen teilweise auffasern und so eine Peritrichie vortäuschen.

Die bei vielen Sp. während des Lebens wahrnehmbare, undulierende Membran (Spirochäta balanitidis, Spirochäta von Ulcus tropicum, Hühnerspirochäte usw.) kann man in Ausstrichen manchmal mit der Löfflerschen Geißelfärbung (S. 27) darstellen. Dazu ist besonders eine Vorbehandlung des dünnen Ausstrichmaterials mit destilliertem Wasser oder eine kurze Anmazeration durch 1 : 10 taurocholsaueres Natrium anzuraten.

Nach Weidenreich-Hoffmann und Halle ist für die Darstellung der Spirochäten auch folgende Methode empfehlenswert: 5 ccm 1 proz. Osmiumsäure werden in eine flache Glasdose gegossen und 10 Tropfen Eisessig werden hinzugefügt. Gut gereinigte Objektträger oder Deckgläschen werden über die Dose gelegt und der Ein-

wirkung der Dämpfe mindestens 2 Minuten ausgesetzt. Hernach fertigt man rasch über der „Dampfseite“ des Objektträgers oder Deckgläschens den Ausstrich an und läßt ihn zur Vollendung der Fixierung über der Glasdose 1—2 Minuten trocknen. Schließlich läßt man auf die Präparate für eine Minute eine dünne, hellrote Kaliumpermanganatlösung einwirken.

Nach dem Auswaschen färbt man entweder nach Giemsa oder mit Triacid. Alfred Kraus (Münchner m. W. 06 No. 52) empfiehlt, die nach der Weidenreich-Hoffmann-Halle'schen Methode angefertigten mit Giemsa gefärbten Präparate zur Beseitigung der Farbstoffniederschläge in 30 % wässrige Tanninlösung zu bringen. ca. ½ Minute. Spirochäten rot auf hellem Grunde. Hartmann und Mühlens (Zeitschr. f. Hyg. 06) untersuchten die Spirochaeta dentium und buccalis, in dem sie eine Normalöse des in 1 großen Tropfen Wasser und 1 Tropfen 1 % Osmiumsäure verteilten Ausgangsmateriales auf einem entfetteten Objektträger ausstrichen. Färbung: namentlich Karbolfuchsin und Löffler's Geißelfärbung.

Nikiforoff färbt Rekurrensspirochäten in Schnitten nach folgender Methode:

1. Fixierung in einer Mischung zu gleichen Teilen Kali bichromicum 5proz. in wässeriger Lösung und gesättigte Sublimatlösung in 0,6proz. NaCl-lösung.
2. Alkoholhärtung.
3. Paraffineinbettung.
4. 24stündige Färbung: in alk. 1proz. Tropäolinlösung 5 ccm; konzent. wässerige Methylenblaulösung 10 ccm und Ätzkalilösung (1 : 1000) zwei Tropfen.
5. Wasserspülung.
6. Eintauchen in Alkoholäther.
7. Bergamottöl-Xylol-Kanadabalsam.

Kultivierung: Levaditi gelang es, die Hühnersp. in Kollodiumsäckchen in der Bauchhöhle eines Kaninchens anzureichern. Ebenso glückte ihm (C. R. h. d. B. No. 27, 06) die Anreicherung der Spirochaeta refringens: Eiter einer balanoposthitischen Erosion wurde in nicht koaguliertem Menschenblut ausgesät und in Kollodiumsäckchen gebracht. Diese kamen auf 4 Tage in die Bauchhöhle von Kaninchen. Spätere Aussaaten in nicht erhitztem Menschenserum blieben in Kollodiumsäckchen 5—8 Tage in der Bauchhöhle der Kaninchen. Mühlens hat ferner die Mundspirochäten in Pferdeserumagar (1:3) in hoher Schicht (Schüttelkultur) und Serumbouillon unter streng anäroben Verhältnissen nach 10 Tagen gezüchtet (Deutsche med. Wochenschrift S. 797, No. 20, 30. Jahrg., 1906). Genauere Angaben finden sich: Mühlens und Hartmann Zeitschrift f. Hygiene, 06. Schüttelkulturen: Agarröhrchen (Reaktion schwach alkalisch oder besser neutral) zur Austreibung des Sauerstoffs $^1/_2$ St. gekocht. Nach Abkühlung auf 45^0 Zusatz von Pferdeserum, das etwa $^1/_2$ St. auf 58—60^0 erhitzt worden ist und sich auf 45^0 abgekühlt hat (2 Teile Agar, 1 Teil Serum). In den noch flüssigen Serumagar (40—42^0) wird aus einer in Serumbouillon angelegten Verdünnung des Ausgangsmaterials mit Platinnadel geimpft, sodann zur Gewinnung möglichst isolierter Kolonien eine weitere Verdünnung angelegt. Der geimpfte und geschüttelte Agar wird, nachdem er erstarrt ist, auf 37^0 (nicht Zimmertemp.) gebracht. Wachstum nach 9—12 Tagen (hauchartige, weißliche Trübungen). Agarsäule wird zur Untersuchung der Kolonien in Scheiben geschnitten. An Stelle des Pferdeserums kann: Hammel-, Kalbs-, Kaninchen-, Ziegenserum sowie Aszitesflüssigkeit (Erfolg unsicher) treten. Schüttelkultur kann durch Stichkultur ersetzt werden.

Treponema pallidum. („Syphilisspirochäta“.)

Für die Färbung der Tr. geben Schaudinn und Hoffmann (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 20, 1904, S. 527) folgende Methode an: „Die gut fixierten Deckgläser kommen für 16 bis 24 Stunden in eine stets frisch hergestellte Mischung von:

1. 12 Teilen Giemsas Eosinlösung (2,5 ccm einprozentige Eosinlösung auf 500 ccm Wasser).
2. 3 Teile Azur I (Lösung 1:1000 Wasser).
3. 3 Teile Azur II (Lösung 0,8:1000 Wasser).

Nach kurzem Abspülen in Wasser werden die Deckgläser getrocknet und in Zedernöl eingeschlossen.“

Die dünnen Ausstriche werden in der Weise hergestellt, daß man die Tröpfchen von durch Schaben und Reiben gewonnenem Reizserum (Hoffmann) oder durch Quetschen mit einer Pinzette herausgepreßtem Quetschserum auf ein Deckglas bringt und nach Art der Blutausstriche durch ein anderes Deckgläschen verstreicht. Trocknen an der Luft. 10 Minuten Fixierung in Alk. absolut.

Giemsa (Deutsche med. Wochenschr. 1905, No. 26, S. 1026) gibt folgende fertige, bei Grübler (Leipzig) käufliche Lösung an:

Azur II-Eosin	3,0 g
Azur II	0,8 „
Glyzerin (Merk)	250,0 „
Methylalkohol (Kahlbaum I)	250,0 „

Von dieser, in einer dunkeln Tropfflasche aufbewahrten Farblösung fügt man in einem weiten, gut gereinigten Meßzylinder je einen Tropfen zu 1 ccm dest. Wasser und färbt die Deckglaspräparate in einer Farbenplatte etwa 1 Stunde. Abspülen. Hoffmann gibt 15 Tropfen der Lösung auf 10 ccm Aq. dest.

Kiewiet de Jonge färbt mit folgender Mischung:

Azur II . . .	0,160,
Eosin	0,100,
Äthylalkohol ad	100,000.

Mit der Pipette werden 15 Tropfen der Farblösung auf das Objekt gebracht, dann kommen gleich 30 Tropfen Aqua destillata, und das Ganze wird durch vorsichtiges Blasen gemischt. Färbungsdauer 1 Stunde. Abspülen im Wasserstrahl. Trocknen. Zedernöl.

Außerdem seien hier noch folgende Methoden angeführt:

a) May (Münchener med. Wochenschrift Jahrgang 53, No. 8) färbt mit einer 0,25proz. methylalkoholischen Lösung von eosinsauerem Methylenblau, bringt dann die Präparate auf 1 Minute ins destill. Wasser, und ohne abzutrocknen fügt er dazu einen Tropfen einer 0,5proz. Methylenazurlösung; nach etwa 2—4 Minuten tritt die endgültige Färbung ein.

b) Gonder und Hoffmann färben 24 Stunden mit frischer Anilinwassergentianaviolettlösung.

Plöger färbt eine Minute lang mit 10proz. einer konzentrierten alkoholischen Gentianaviolettlösung in $2^1/_2$proz. Karbollösung und spült dann gut mit Wasser ab.

c) Reitmann (Deutsche med. Wochenschrift 1905, No. 25, S. 997) fixiert die dünnen Ausstriche 10 Minuten in absolutem Alkohol, spült im Wasser ab und überführt sie etwa auf 5 Minuten in eine 2proz. Phosphorwolframsäurelösung, wäscht dann in Aqua dest. und 70proz. Alkohol, dann abermals in Aqua dest. und färbt unter Erwärmen bis zur Dampfbildung mit einer verdünnten Karbolfuchsinlösung.

d) Herxheimer (Münch. med. Wochenschrift 39, 26. September 1905) und Herxheimer und Opificius (Münch. med. Wochenschrift No. 7, 13. Februar 1906) färben mit einer filtrierten, heißgesättigten Gentianaviolettlösung (10 g Gentianaviolett in 100 ccm Aq. dest.) 15 Minuten, Wasserspülung, Trocknen, Kanadabalsam.

Herxheimer und Hübner (Deutsche mediz. Wochenschrift 1905, No. 26, S. 1023) empfehlen fil-

trierte, wässerige Lösungen von Nilblau BR oder Capriblau 1:1000 (16—24 Stunden).

e) Davidson (Berliner klinische Wochenschr. 31, 1905) löst etwa eine Messerspitze von Kresylviolett „Rextra" der Mülheimer Farbenfabrik in 100 ccm Wasser und färbt damit verschieden lang die Syphilisspirochäten.

f) Färbung der Sp. mit Löfflers Geißelbeize (S. 000); die Ausstriche müssen möglichst dünn sein, daher muß man das Ausgangsmaterial stark verdünnen (auch für Framboisiaspirochäte Balanitis- und Ulcustrop.-Spirochäte zu empfehlen).

g) Berger (Münchener med. Wochenschrift 1906, No. 25) fixiert die Ausstriche 5—10 Minuten im absoluten Alkohol, behandelt sie eine Minute mit einigen Tropfen Azur II vor; abspülen, trocknen. Färbt 3—5 Minuten mit einer Dahliastammlösung: 4 ccm konz. alkohol. Dahlialösung in 20 ccm Aqua dest. Abspülen, trocknen. Neutraler Kanadabalsam.

h) dünne, lufttrockene nicht fixierte Deckglasausstriche färbt Marino mit einigen Tropfen Marinoblau (Bleu de Marino 0,1, Methylalkohol 20,0). Nach 3 Minuten kommen dazu einige Tropfen einer wässerigen Eosinlösung (0,05:1000,0). Nach 2 Minuten abspülen, einschließen in Zedernöl.

Im übrigen sei auf meine Zusammenstellung in der Zeitschrift f. wissenschaftl. Mikroskopie Bd. 32. 1906. S. 1—12 verwiesen.

Für den Nachweis der Treponema ist die Anwendung der Schnittechnik von besonderer Wichtigkeit.

Zunächst sei hier die ältere Methode von Bertarelli und Volpino (Zentralbl. f. Bakteriologie I. Abt., 40. Bd., 1905, Heft 1) angeführt: Die sehr dünnen Schnitte (—5 μ) bleiben 24—48 Stunden in einem 0,2—0,5proz. Silbernitratbad. Daraufhin werden sie ausgewaschen und kommen in ein Bad von 3,0 Tannin, 5,0 Acid. gallic., 10,0 Natrium acet. fus., 350,0 Aq.

dest., das zur Geißelfärbung nach von Ermengen benutzt wird. Nach $^1/_4$ Stunde kommen die gelblich verfärbten Schnitte in das oben beschriebene Silbernitratbad und verbleiben dort so lange, bis sie einen bräunlichgelben Farbenton angenommen haben.

Die am meisten benutzte Methode der Treponemaschnittfärbung nach Levaditi (Ann. Inst. Pasteur, No. 1, 25./106, vol. 20, p. 43) sowie Compt. rend. soc. d. l. Biologie, vol. 60, No. 3, 26. Januar 1906) sei hier in der etwas abgeänderten Form von Hoffmann und Beer (Deutsche med. Wochenschrift 1906, No. 22) angegeben:

1. Formalinfixierung (1 Teil Formalin + 9 Teile Wasser) 24 Stunden lang oder länger.

2. Übertragung 1—2 mm dicker Scheiben in 96proz. Alkohol über Nacht.

3. Überführung in destilliertes Wasser (einmal wechseln) bis zum Sinken der Stücke (15 Minuten).

4. Die an feinen, weißen Zwirnfäden aufgehängten Stücke kommen in eine jedesmal frisch zu bereitende Mischung von 90 ccm, 1,5proz. Silbernitratlösung und 10 ccm reinsten Pyridins und verbleiben dort 3 Stunden bei Zimmertemperatur und weitere 3—5 Stunden im Thermostaten bei 45—50° (dunkle Flasche mit Glasstopfen).

5. Dann kommen sie in eine jedesmal frisch zu bereitende Reduktionsmischung:

a) 90 ccm 4proz. Pyrogalluslösung + 10 ccm reinen Azetons (Stammlösung).

b) 85 ccm von a) + 15 ccm Pyridin, hierin verbleiben die Stücke bei Zimmertemperatur über Nacht

6. Rasche Paraffineinbettung. Die Schnitte kann man mit 1 % Jodgrün oder Toluidinblau nachfärben. Für Vergleichszwecke kann man die Sp. nach Versè durch braune Jodjodkaliumlösung, Abspülen im Wasser und konzentrierte Natriumthiosulfatlösung wieder entfärben.

Für den Nachweis der Treponema sind folgende Methoden zu empfehlen:

1. Mikroskopische Untersuchung der nach der Methode von Giemsa oder nach einer anderen oben angeführten Methode gefärbten Ausstriche.

2. Mikroskopische Untersuchung des Drüsenpunktionssaftes (frisch oder gefärbt). Vgl. Hoffmann Die Ätiologie der Syphilis, Springer 1906.

3. Nachweis der Spirochäten im Blute nach der Methode von Noeggerat and Staehelin (Münch. med. Wochenschrift 1905, No. 31, S. 1481): man fängt mindestens 1 ccm Blut aus einer Vene oder aus dem Ohrläppchen in einer ungefähr zehnfachen Menge $^1/_3$proz. Essigsäure auf, zentrifugiert das Ganze in einer starken Zentrifuge und verarbeitet den Bodensatz zu Ausstrichpräparaten.

4. Exzision der fraglichen erkrankten Teile und der histologische Nachweis der Treponema nach der Silberimprägnierungsmethode.

5. Verimpfung des Reizserums oder des durch Punktion gewonnenen Drüsensaftes nach der Methode von Hoffmann (Deutsche med. Wochenschrift 1905, No. 18, S. 712) an ein empfängliches Tier (Affe, vordere Augenkammer des Kaninchens, Bertarelli), kürzeste Inkubation beim Affen etwa 14 Tage.

Das zerkleinerte Material (auch Stücke von winziger Größe) bringt man in die vordere Augenkammer des Kaninchens und weist die Trep. nach der Levaditischen Methode in dem Bindegewebe unterhalb der Bowmanschen Membran des Corneaepithels (etwa nach zwanzig Tagen) nach. Mir gelang es nicht, die Treponema direkt im Kammerwasser (Mensch, Affe, Kaninchen) zu entdecken.

Die Treponema untersucht man lebend (etwas mit 0,85 % NaCl-Lösung verdünnt) im sorgfältig mit Vaseline umrandeten Deckglaspräparat (O-Abschluß) mit

homog. Immersion und Okular 8, 12. Man kann sie ziemlich lange Zeit — nach Beer etwa vier Wochen — im beweglichen Zustande in solchen Präparaten halten (Hoffmann, Beer, Reuter).

Für Serumversuche (das Serum wird am besten nach der Wright'schen Methode in Glasröhrchen aufbewahrt und mit einer Normalöse dem hängenden Tropfen zugesetzt; gleichzeitig Kontrolle) empfiehlt sich die Untersuchung im hängenden Tropfen.

III. Klasse. Sporozoa.

I. Ordnung. Hämosporidia.*)

Malaria.

Zunächst ist das Studium des lebenden Objektes anzuraten. Dazu ist allerdings gutes Licht und Übung in der Blendenbenutzung Voraussetzung. Nach Schaudinn kann man mit einiger Vorsicht denselben Parasiten 3—4 Stunden unter dem Mikroskop ohne Entwicklungsstörungen beobachten.

Auf einen entfetteten Objektträger bringt man einen kleinen Blutstropfen, legt darüber rasch ein Blutdeckgläschen, so daß überall an den Rändern etwas von dem Blut, das mit dem Fließpapier entfernt wird, heraustritt und umrandet das Präparat mit Vaseline oder Wachs. F. Plehn entnimmt das Blut unter Vaselineabschluß aus der Fingerbeere und fängt es auf einem Deckglas mit einem Tropfen flüssigen Paraffins auf, so daß das Blut kaum mit der Luft in Berührung kommt.

Schaudinn benutzte auch die feuchte Kammer nach F. E. Schulze. Sie wird mit grünen Algen beschickt und zugedeckt in den Thermostaten (über 37°)

*) Neueren Forschungen zufolge ist es zweckmäßiger, diese Ordnung an die Flagellaten (Trypanosomen) Klasse Mastigophora anzugliedern.

gestellt. Heizbarer Objekttisch (nach Pfeiffer) ist zu empfehlen. Vitalfärbungen mit Methylenblau und Neutralrot bieten keine wesentlichen Vorteile.

Anfertigung von Dauerpräparaten. Ausstrichpräparate.

Man sticht mit einer ausgeglühten Nadel, Lanzette, neuen Feder oder mit einem Blutschnepper (bequem bei der Untersuchung der Kinder) in das Ohrläppchen oder die Fingerbeere, die vorher mit Alkoholäther gut gereinigt wurde, ein, läßt den ersten Blutstropfen abfließen und fängt den zweiten mit der Kante eines Deckgläschens oder mit einem dünnen Glasstab auf. Der Blutstropfen am Deckglasrand darf nicht zu groß sein. Dann setzt man das Deckgläschen in einem Winkel von 45° an einen gut gereinigten, entfetteten Objektträger an und verstreicht das Blut in einer möglichst dünnen Lage. Auch kann man statt des Objektträgers ein anderes Deckgläschen nehmen und die beiden Deckgläschen ohne Druck aneinander abziehen. Oder man berührt den vorquellenden Blutstropfen mit einem geraden, dünnen Glasstab, an dem das Blut entlangläuft. Hierauf wird mit der bestrichenen Seite des Stabes ein Ausstrich am Objektträger angefertigt. Christophers und Stephans bedienen sich hierzu einer ganz glatten, nicht zu oft ausgeglühten Nadel.

Nach Horcizka und Lenz kann man den Blutstropfen mit dem Rande eines Zigarettenpapiers auffangen und dann mit ihm einen Objektträger entlangfahren. Durch die Adhäsion des feuchten Papiers an den Objektträger werden die Blutkörperchen in einer dünnen Schicht ausgebreitet.

Die lufttrockenen Präparate werden etwa 10 bis 15 Minuten im Alkohol absolutus fixiert. Oft wird eine Mischung von Alkohol (96proz.) und Äther zu gleichen Teilen angewendet.

Die nicht fixierten Präparate sind möglichst trocken aufzubewahren. Es ist darauf zu achten, daß sie besonders beim Transport nicht der Körperwärme und dem Schweiße ausgesetzt werden.

I. Für rasche Diagnosenstellung ist die Färbung mit Mansons Methylenblaulösung anzuempfehlen:

Stammlösung: 100 ccm Wasser (kochend),
Borax 5,0,
Methylenblau med. pur Höchst 2,0.

Die Lösung wird so stark verdünnt, daß das Licht durchscheint. Man färbt etwa 10—15 Sekunden, bis das Präparat mattgrün ist.

Alte Präparate werden mit 1proz. Methylenblaulösung (+ 0,2proz. Soda) gefärbt, doch fällt bei sehr alten, aus den Tropen stammenden Präparaten die Färbung oft schlecht aus.

II. Meistens werden die Malariapräparate nach der Methode von Romanowsky, die von Ziemann, Nocht, Laveran, Ruge, Maurer Reuter, Leishmann, Wright mannigfach modifiziert worden ist, gefärbt. Hierzu stellt man sich zunächst zwei Stammlösungen her:

1. Eine 1proz. Methylenblaulösung (Methylenblau med. pur. Höchst) mit 0,3—0,5proz. Soda. Sie muß längere Zeit reifen, d. h. etwa zwei Tage im Paraffinschrank bei 50—60° C oder acht Tage im Blutschrank bei 37° stehen, damit sich genug „Rot im Methylenblau" bildet.

Maurer stellte in den Tropen die Lösung auf zwei Tage in die Sonne und ließ sie dann etwa acht Tage vor dem Gebrauch im Zimmer stehen.

Zur Konservierung diente $^1/_4$proz. Formalin. Die Farblösung muß vor dem Gebrauch einen rotvioletten Schimmer besitzen.

2. Eine wässerige 1proz. Eosinlösung (echt französisch).

Bei der Färbung verfährt man dann folgendermaßen: Nocht (Zentralbl. f. Bakteriologie Bd. 25, 1899) gibt zu 1—2 ccm Wasser 2—3 Tropfen Eosin und setzt dann tropfenweise von dem Methylenblau so lange hinzu, bis nichts von dem Eosin zu sehen ist. Auf dieser Lösung läßt man die Präparate 5—10 Minuten schwimmen. Abspülen, trocknen, Zedernöl.

Ruge (Handbuch der pathogenen Mikroorganismen von Kolle und Wassermann 1903) versetzt 10 ccm destill. Wassers in einem Erlenmeyerkolben mit 1 ccm der 1proz. alkalischen Methylenblaulösung und fügt mit einer graduierten Pipette tropfenweise unter beständigem Schütteln die 1proz. wässerige Eosinlösung hinzu, bis ein Niederschlag auftritt (also etwa 0,3—0,6 ccm Eosinlösung).

Die Ausstriche legt man mit der bestrichenen Seite nach unten in die Farbenflotte und erwärmt mäßig über der Flamme eines Bunsenbrenners, bis sich ein metallisches Häutchen auf der Farbenflotte bildet.

Das Auftreten dieses Häutchens ist gleichsam das Signal für das Zustandekommen einer guten Chromatinfärbung. Hernach wird es mit dem Fließpapier entfernt, das Präparat im destill. Wasser gründlich abgespült, getrocknet und in Zedernöl eingeschlossen. Alte Präparate, die in der Lösung überfärbt werden, müssen mit Essigsäure differenziert werden (ein Tropfen Essigsäure auf ein Glas Wasser).

Giemsa stellte seine Farblösung in der Weise her, daß er 10 ccm von 0,05promill. Höchster franz. Eosin mit 1 ccm von Azur 0,8promill. in einem reinen Meßzylinder vermischte. (Vgl. ferner die anderen, besonders zu empfehlenden Abänderungen der Methode von Giemsa S. 36.)

Im allgemeinen färbt man jetzt meistens mit der fertigen käuflichen (Grübler) Giemsalösung

(1 Tropfen auf 1 ccm Aq. dest. Färbung 1 Stunde, abspülen, trocknen, Zedernöl).

Man kann auch nach der Methode von Ross einen großen Blutstropfen auf dem Objektträger eintrocknen lassen und dann ohne zu fixieren das Präparat bis zur völligen Lösung der Blutkörperchen in die oben erwähnte Eosinlösung hineinlegen. Erst nach dieser Prozedur wird fixiert und in der üblichen Weise nach Giemsa gefärbt.

Methode der nassen Konservierung.

Schaudinn (Studien über krankheitserregende Protozoen II Plasmodium vivax, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 19, Heft 2, 1902) empfiehlt die Fixierung mit Hermannscher Flüssigkeit:

1proz. Platinchlorid	15 Teile,
2proz. Osmiumsäure	4 Teile,
Essigsäure	1 Teil.

Einige Tropfen Blut läßt man direkt in ein Zentrifugiergläschen mit der erwähnten Fixierungsflüssigkeit hineinfallen, wäscht unter Zentrifugieren mit Aqua dest. aus, setzt einige Tropfen Grenachers Hämatoxylin zu und untersucht entweder im Wasser, Glyzerin oder essigsaurem Kali (gut für achromatische Strukturen) oder man bringt das Blut durch die Alkoholreihe in Xylol und Zedernöl.

Für die chromatischen Strukturen ist die oft erwähnte Sublimatalkoholfixierung geeigneter: $^1/_3$ Alkohol 90 % + $^2/_3$ Sublimat konzentr. (wässerig) im heißen Zustande angewandt. Den oben angefertigten Blutausstrich läßt man rasch wagerecht auf das heiße Fixierungsgemisch auffallen. Waschen im Wasser, 60proz. Jodalkohol, Färbung mit verdünntem Grenachers Hämatoxylin oder Heidenhains Eisenhämatoxylin (Beize 24 Stunden, ebenso lange Färbung), Alkoholreihe. Xylol, Zedernöl.

Auf diese Weise werden auch Gewebsausstriche (Milz und Knochenmark) fixiert und nachbehandelt.

Diese Methoden sind den trockenen Ausstrichmethoden insofern vorzuziehen, als die Kernstrukturen besser erhalten werden.

Gewebsstücke (Milz) werden in toto mit Sublimatalkohol oder mit Hermannscher Mischung fixiert, Auswaschen, Alkoholreihe, Chloroform, Chloroformparaffin, Paraffineinbettung. Für die Färbung der Schnitte ist zu empfehlen: Hämalaun nach Mayer, Rawitz' Glyzerin-Alaun, Hämatein und Eisenhämatoxylin mit Eosin oder Bordeauxrotnachfärbung (Bordeauxrot ist in Spuren der zweiten Differenzierungsbeize zuzusetzen). —

Überträger der Malaria sind Anopheles. Für ihren Fang bedient man sich eines breiten Zylinderglases, das oben mit einem dicht schließenden, in der Mitte durchbohrten Korkpfropfen verschlossen ist. Durch die Öffnung wird ein niedriger Glas- oder besser Blechtrichter durchgesteckt, den man behutsam über die meist auf der Decke oder in einem schattigen Winkel sitzende Anophele stülpt und sie dann mit einem viereckigen Blechstück, das man rasch zwischen die Unterlage und den Trichterrand durchschiebt, in den Trichter hineinjagt; meist fliegt die Mücke auf und kommt so von selbst in das Zylinderglas, eventuell kann man durch geeignetes Schütteln sie dahin treiben.

Für Transportzwecke sammelt man die Mücken in einem zweiten, größeren, trockenen Glasgefäß, das oben mit Gaze verschlossen ist. Auch kann man etwas Reisig hineinlegen. Nocht hat für den Fang besondere Fanggläser konstruiert (vgl. Handbuch der pathog. Mikroorganismen S. 825, I. Bd.). Ähnliche Gefäße sind von der Firma Lautenschläger, Berlin, Oranienstraße, zu beziehen.

Für Versuchszwecke ist ein viereckiger, mit Gaze

überzogener Käfig zu empfehlen, in den man die Mücken hineinläßt. Er muß so groß sein, daß für Proteosoma- oder Halteridiumversuche ein anderer Käfig mit Sperlingen oder Käuzchen hineingesetzt werden kann. Auch muß man unter den Gazekäfig eine flache Schale mit Wasser setzen, damit die vollgesogenen Mückenweibchen Gelegenheit haben, die Eier abzulegen.

Schaudinn brachte in die Gazekäfige blühende Blumen und verschiedene feingeschnittene Früchte, die ab und zu durch eine Schale mit Himbeer- oder Kirschsaft ersetzt wurden. Er konnte Männchen und Weibchen bei dieser Fruchtnahrung über zwei Monate erhalten. Der Gazekäfig muß vorn einen gut schließbaren Ausschnitt zum Durchstecken des Armes eines Malariakranken für Versuchszwecke enthalten. In der Dämmerung saugen die Anophelenweibchen leicht. Tiere, die sich zur Überwinterung eingerichtet haben und bereits Fett angesetzt haben, muß man vor dem Saugen hungern und bei einer Temperatur von 24—30° C (in die sie nach und nach zu bringen sind) ihr Fett aufzehren lassen. Die vollgesogenen Weibchen werden dann bei verschiedenen Temperaturen in eigenen gazeüberzogenen Gläsern gehalten und zum Zwecke der Untersuchung zu verschiedenen Zeiten nach dem Saugakt getötet (Äther).

Bei Versuchen mit Proteosoma darf man die Culexmücken nicht an allzu stark infizierten Vögeln saugen lassen, da für die Mücken unter Umständen die Parasiten pathogen sind.

Bei der Präparation der Mücken, die man vorteilhaft auf einer schwarzen Unterlage vornimmt, verfährt man folgendermaßen: Beine und Flügel der mit Äther getöteten möglichst frischen Mücke werden abgeschnitten und die Mücke wird in einen großen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Dann sticht man zum Zwecke der Fixierung mit einer Präpariernadel den Thorax an.

während mit einer anderen, etwas abgestumpften Präpariernadel der letzte Abdominalring abgequetscht und langsam abgezogen wird. Es kommen zuerst die weißen Eierstöcke, dann ein weißlicher Strang — der Darm — mit dem Gewirre von malpighischen Gefäßen zum Vorschein. Das Herausziehen der Eingeweide muß vorsichtig geschehen, damit der Darm nicht frühzeitig durchreißt. Später trennt man den Thorax durch und bekommt so die oben genannten Organteile samt dem Magen frei. Für die ersten Stadien der Cystenbildung muß man den blutgefüllten Magen herauspräparieren. Sobald dieses geschehen ist, legt man das Organpräparat in einen großen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung und entfernt das überschüssige Blut durch vorsichtiges Quetschen und Auffallenlassen eines Deckgläschens auf den blutgefüllten, dunkeln Magen. Diese Prozedur muß man mehrmals wiederholen. Von dem ausgetretenen Blut können Ausstriche angefertigt werden.

Der Darm kann für Schnitte in Sublimatalkohol konserviert werden. Für Totalpräparate wird der Darm in der Leibeshöhlenflüssigkeit zerzupft, und das mit diesen Teilen bestrichene Deckglaspräparat mit der Objektseite wagerecht auf die heiße Sublimatalkoholmischung fallen gelassen. Alles weitere vgl. S. 23. Für die Durchfärbung der Cysten eignet sich stark verdünntes Grenachers Hämatoxylin. Den Grad der Färbung kontrolliert man am besten unter dem Mikroskop. Abspülen im Brunnenwasser, Alkoholreihe, Xylol, Zedernöl.

Totalpräparate werden in Alkohol fixiert, im Glyzerin aufgehellt und mit Asphaltlack umrandet.

Für die Präparation der Speicheldrüsen trennt man mit dem Frosch'schen Messerchen den Dorsalteil des Thorax ab, luxiert den Kopf dorsalwärts, bis der Halsteil von dem restlichen Thorax. der mit einer Präpariernadel zu fixieren ist, abgetrennt wird. Bei dieser

Operation bleiben die Speicheldrüsen an dem Halsteil hängen. Die Speicheldrüsen werden dann völlig frei unter dem Mikroskop herauspräpariert. Bei dieser Prozedur ist es gut, die überschüssige Kochsalzlösung mit dem Fließpapier zu entfernen. Die ganze Speicheldrüse besteht aus zwei langen Seitenschläuchen und einem mittleren kürzeren Teil, den Macloskie Giftlappen genannt hat. Bei der letzten Präparation bediene man sich verschieden geschärfter oder mit einem Häkchen versehener Präpariernadeln. Eine binokuläre Prägararierlupe mit Stützplatten leistet dabei gute Dienste.

Weiteres über die Präparation findet man in dem Artikel „Malariaparasiten“ von Ruge (Handbuch für pathogene Mikroorganismen von Kolle und Wassermann 1. Bd., 1903), und in Eysell, „Wie weist man Hämosporidien im Culicidenleibe nach“, Arch. f. Schiffs- und Tropenhyg. 1902, S. 160).

Schaudinn untersuchte die ersten Stadien der Sporogonie nur in der Körperflüssigkeit aus dem Abdomen von etwa 6—10 rasch vorher präparierten Anophelen (nicht Normalsalzwasser oder Eiweiß).

Für Schnitte müssen die in Sublimatalkohol konservierten, der Beine und Flügel beraubten Mücken an mehreren Stellen ihres Körpers Öffnungen zum Eintritt von Paraffin erhalten. Für Celloidinschnitte legt Eysell die Mücken in einen Einschnitt von Sonnenblumenmark und entfernt mit einem in Alkohol befeuchteten Messer einzelne oberflächliche Teile des Kopfes, Thorax und Abdomens.

Für besondere Experimente muß man die Culiciden und Anophelen selbst aus den Eiern züchten. Man läßt zu diesem Zwecke die blutgesogenen Weibchen in den Gazekäfigen ihre Eier an die Oberfläche der oben erwähnten Glasschale absetzen und sorgt für die Fütterung der ausgekrochenen Larven.

Nach Schaudinn sind die Anopheleslarven mehr Fleisch-, die Culexlarven mehr Pflanzenfresser. Anopheleslarven hält man in 10—15 cm breiten, 4—5 cm tiefen, mit Algen besetzten Glasschalen zu etwa zwanzig Stück, filtriert für diese aus einer mit etwas Jauchewasser versetzten Cladoceren-(Wasserflöhe)Kultur einige Dutzend Wasserflöhe ab, zerkleinert sie und streut sie auf die Oberfläche der Glasschalen. Auch junge Culexbrut kann in derselben Weise behandelt als Futtermittel dienen. Damit das Wasser nicht faulig wird, muß man es jeden dritten Tag wechseln (vgl. Kerschbaumer, Malaria, ihr Wesen, ihre Entstehung und ihre Verhütung. Wien, Braumüller 1901. Grassi, Die Malaria, Studien eines Zoologen, Jena, Gustav Fischer 1901).

Die übrigen Hämosporidien werden in ähnlicher Weise untersucht. Für Chromatinstudien bei Halteridien und Leukozytozoen leistet ein leichtes Anmazerieren der Parasiten durch eine stärkere physiologische Kochsalzlösung, in der man sie längere Zeit liegen läßt, gute Dienste. — Jedesmal muß man die Biologie des betreffenden Zwischenwirts genau studieren und diesen womöglich aus dem Ei züchten, da Doppel- und Mehrfachinfektionen der übertragenden Zwischenwerte vorkommen können, die dann das ohnehin verwickelte biologische Bild erheblich trüben. Dabei darf man die Möglichkeit einer „vererbten“ Infektion der Eier (Pebrine der Seidenraupen, Malaria, Halteridium, Herpetomonas, Schildkrötenmalaria, Karyolysus, Piroplasmen, Spirochäten usw.) nicht außer acht lassen.

Unterordnung. Piroplasmen.

Die Piroplasmen des Blutes werden nach derselben Methode wie die Malariaplasmodien behandelt (alkalisches Methylenblau, Romanowsky-Giemsa-Färbung, Fixierung mit Sublimatalkohol oder mit Hermannscher

Flüssigkeit, Nachfärbung mit Grenachers Hämatoxylin und so weiter).

Nach Kossel sind auch basische Anilinfarbstoffe wie Methyl- und Gentianaviolett, Hämatoxylin, weniger Fuchsin geeignet.

Kossel und Weber (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 17, 1900) fixierten die Ausstriche mit Alkohol absolut. und färbten mit alkalischer Methylenblaulösung.

R. Koch (Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 54. Bd., I. Heft, 1906) und Kleine färben die Parasiten nach der Methode von Giemsa.

Kleine (ebend. S. 13) konnte bestimmte Veränderungen an den Piroplasmaparasiten beobachten, sobald er das Blut junger, mit Hundepiroplasmen infizierter Hunde kurz vor dem Tode defibrinierte und damit etwa 20 sterilisierte Reagensgläser beschickte.

Die Reagensgläser enthielten je 0,5 ccm physiologische Kochsalzlösung und 0,5 ccm Blut. Das so verdünnte Blut wird bei einer Temperatur von etwa 27° C gehalten. Nach etwa 18 Stunden gießt man die obere, klare Flüssigkeit ab und findet in dem Bodensatz die von R. Koch beschriebenen eigenartigen Gebilde.

2. Ordnung. Koccidien.

Für Konservierung von Koccidien eignet sich besonders eine Mischung von zwei Teilen wässeriger konzentrierter Sublimatlösung und einem Teil absolut. Alkohol mit einem Zusatz von Eisessig (Schaudinn). Siedlecki fügt der Sublimatlösung 0,25proz. Essigsäure hinzu. Außerdem ist das Hermannsche Gemisch (15 Teile 1proz. Platinchloridlösung, 1 Teil Eisessig, 2 Teile (oder vier) 2proz. Osmiumsäure) oder starkes Flemmingsches Gemisch (1proz. Chromsäure 15 Teile, 2proz. Osmiumsäure 4 Teile, 1 Teil Eisessig) für eine länger dauernde

Fixierung der möglichst kleinen Stücke zu empfehlen (gründliches Auswaschen).

Für Deckglasausstriche ist die sogen. feuchte Methode anzuwenden, d. h. man läßt die feuchten, eben hergestellten Ausstriche horizontal auf das oben bezeichnete heiße Sublimatalkoholgemisch auffallen, wäscht nach einer halben Stunde im Wasser und Jodalkohol (60 proz.) aus und färbt nach Belieben. Moroff und Fiebiger tingierten die Ausstrichpräparate nach der Methode von Giemsa (vgl. Trypanosomen).

Nächst der Ausstrichmethode ist aber jedesmal die Schnittmethode und die Untersuchung des lebendigen Objektes anzuwenden. Im letzteren Falle untersucht Wasielewski (Sporozoenkunde, Jena 1896) die Parasiten entweder in ihrem natürlichen Medium oder in physiologischer Kochsalzlösung oder in einer Eiweißlösung, die aus 20 ccm Hühnereiweiß, 200 ccm Wasser und 1 g Kochsalz hergestellt wird.

Pianese (Arch. parasit. Paris, Tome 2, 1899, p. 412) fixiert die Leberkoccidien in einem Gemisch von 20 ccm 10 proz. wässeriger Kobaltchloridlösung, 5 ccm 2 proz. Osmiumsäurelösung und 1 Tropfen Ameisensäure. Auch die Fixierung mit Pikrinessigsäure (3 Teile konzent. Pikrinsäurelösung, 1 Teil Eisessig [Davidoff], Auswaschen gleich im 70 proz. Alkohol) findet vielfach Anwendung.

Gefärbt wird mit Grenachers Hämatoxylin (1 ccm des käuflichen Farbstoffes v. Grübler [auch Alaunhämatoxylin genannt] auf 200 ccm Wasser), das man etwa 24 Stunden einwirken läßt und eventuell bei Überfärbung mit schwachem, salzsauerem Alkohol differenziert (Auswaschen im Brunnenwasser). Ferner werden die Koccidien mit Mayers Hämalaun (Siedlecki) oder Heidenhains Eisenhämatoxylin mit Bordeauxrotnachfärbung tingiert. Auch Säurefuchsinfärbungen sind in manchen Fällen geeignet; ferner Gentianaviolett und Vesuvin.

Hämatoxylinfärbungen sind mit Orange G und Eosinnachfärbungen zu kombinieren, wobei jedoch das Eosin in starker Lösung längere Zeit hindurch anzuwenden ist. (Vgl. Schaudinn, Untersuch. ü. d. Generationswechsel bei Koccidien. Zool. Jahrb., Abt. f. Morph. v. 13, 1900 und Arb. aus d. Kaiserl. Grundbuchamte 18, 3. Heft, 1902.) Zum Studium der Auswanderung und Schicksale der Sporozoiten empfiehlt es sich, die künstliche Infektion der Wirtstiere vorzunehmen. Moroff (A. f. Protistenk. 06) mischte die reifen Cysten von Adelea zonula, die in den Larven von Blaps mortisaga lebt, zusammen mit dem Fettkörper mit Kleie, zerrieb die Masse fein, feuchtete sie mit Wasser an und gab sie Larven, die 4—5 Tage gehungert hatten, zu fressen. Ferner vergleiche man die Untersuchungen Metzners im Archiv f. Protistenk. 05.

3. Ordnung. Gregarinen.

Die Art der Bewegung der Gregarinen wird zunächst in einem durch Karminpulver oder Tuschesuspension gefärbten Medium untersucht (Schleimproduktion, Gleiten). Für das Studium der Einschlüsse bedient man sich der Vitalfärbungen (Neutralrot, Brillantkresylblau) sowie einer wässerigen Lösung von Jodjodkalium (Glykogen) oder Methylviolett. Die Präparate werden in Laevulose oder Gummiglyzerin aufbewahrt.

Neben den mit Jodjodkali braungelb färbbaren Körnern, die Bütschli Paraglykogen nennt, und die bei Zusatz von verdünnter Schwefelsäure einen violetten Farbenton annehmen, gibt es noch sogen. karminophile Granula, die sich nach der Fixierung mit Pikrokarmin und Essigkarmin färben. Zum Fixieren der Gregarinen ist das oben bei den Koccidien erwähnte Sublimatalkoholgemisch sowie Pikrinessigsäure (S. 52) geeignet. Lo Bianco konserviert die Parasiten in Pikrinschwefelsäure (100 Teile Aqua dest. + 2 Teile

konzent. Schwefelsäure mit Pikrinsäure gesättigt) eine Stunde lang und wäscht sofort mit 70proz. Alkohol mehrere Stunden aus, bis die gelbe Farbe aus dem Objekt verschwunden ist. Als Färbung der Ausstriche (nasse Methode) ist die Methode von Romanowski zu empfehlen, sonst sind als Färbungen Grenachers Hämatoxylin, Heidenhains Eisenhämatoxylin (Schnitte), Safranin (nach der Fixierung mit Flemmings Gemisch) und Pikrokarmin geeignet.

Für das Studium der Cuticula und ihrer Streifung leistet die Behandlung der Objekte mit Goldchlorid, Essigsäure, Ammoniakwasser und Höllenstein (Silbernitrat 1proz. verdünnt mit dem 2—4fachen Volumen Wasser im direkten Sonnenlichte behandelt) in vielen Fällen gute Dienste.

4. Ordnung. Myxosporidien.

Myxosporidien untersucht man zunächst im lebenden Zustande, indem man die Parasiten oder die parasitenhaltige Flüssigkeit unter ein mit Wachsfüßchen unterstütztes Deckglas bringt. Von dem mit Myxosporidien behafteten Gewebe stellt man Quetsch- oder Zupfpräparate her.

Für das Ausstoßen der Polfäden wird eine ganze Reihe von Reagentien angegeben: Soda, Potasche (direkt oder nach Eintrocknung der Sporen), Glyzerin, Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Essigsäure, Jodlösung, Aqua destillata, Verdauungssäfte des Wirtstieres (Thélohan: Recherches sur les Myxosporidies. Bull sc. de la France et de la Belgique 1895). Auch Fäulnisprozesse können das Herausschleudern der Polfäden bewirken, ebenso Druck (Bütschli: Braun's Klassen und Ordnungen). Schuberg und Schröder (Archiv f. Protistenk. 05) ließen die Sporen auf einem Deckgläschen eintrocknen und wendeten dann Schwefel-

säure oder Salpetersäure an. Auch nach 12—24stündigem Verweilen in Wasser wurden die Polfäden ausgeschleudert. M. Plehn konnte (Archiv f. Prostitenkunde 05) das Ausschnellen durch dünne Alkalien, wie Kalkwasser, das auf die Hälfte verdünnt wurde, oder mit 1proz. Kali oder Natronlauge bewirken.

Stempel (Archiv f. Protistenk. 04) ließ die Sporen von Nosema anomalum zur Darstellung des riesigen Polfadens nach Zusatz von Jodtinktur 24 Stunden in der feuchten Kammer liegen.

Von der Anwesenheit der Vakuole im Amöboidkeim kann man sich durch Zusatz von Alkohol, Osmiumsäure, schwacher Salpetersäure, 2proz. Silbernitrat überzeugen.

Durch Zusatz von alkoholischer Jodlösung oder Lugolscher Lösung werden die Vakuolen oft mahagonibraun gefärbt.

Trennung der die Spore zusammensetzenden Schalen wird bewirkt durch Potasche, Soda, Schwefelsäure, Salpetersäure, langen Aufenthalt im Wasser, Verdauungssäfte des Wirtstieres (Thélohan) und Fäulnis.

Deckglasausstriche von Sporenmaterial oder Entwicklungsstadien der Sporen läßt man trocknen (weniger zu empfehlen), fixiert in absolutem Alkohol und färbt nach der Methode von Giemsa, oder man fixiert auf „nassem Wege“ mit $^2/_3$ konz. wässriger Sublimatlösung + $^1/_3$ absolut. Alkohol (heiß), indem man die Präparate mit der Schichtseite auf das Gemisch horizontal auffallen läßt, wäscht mit 60proz. Jodalkohol aus und färbt mit verdünntem Grenacherschen Hämatoxylin (Grübler). Diese Methode ist besonders bei Ausstrichen aus mit Pebrine infizierten Seidenraupen zu empfehlen. Ferner kommen die für Schnittpräparate angewendeten Fixierungsmittel in Betracht.

Für Schnitte fixiert man mit dem oben angeführten Sublimatalkoholgemisch, mit Flemming'schen (Thélohan)

oder Herrmann'schem Gemisch (beide zu empfehlen), mit Kaliumbichromatessigsäure nach Tellyesniczky: Kaliumbichromat 3 g, Essigsäure 5 ccm, Wasser 100 ccm. Kleine Objekte bleiben darin 1—2 Tage, werden gut mit Wasser ausgewaschen und durch die Alkoholreihe von 15 Proz. an durchgeführt. Ferner kann man das Orth'sche Gemisch (10 Teile Müller'sche Flüssigkeit + 1 Teil Formol), Pikrinessigsäure und nach Doflein Pikrinschwefelsäure (1 ccm konz. Schwefelsäure auf 100 ccm gesättigter Pikrinsäurelösung in Wasser) anwenden. M. Plehn (Lentospora cerebralis) fixiert mit Formal-Sublimat-Eisessig nach Oppel.

Gute Färbungen werden mit Boraxkarmin, Gentianaviolett und Eosin, Hämatoxylin und Safranin (nach Flemming'schen und Herrmann'schen Gemisch) erzielt. Für Schnitte ist auch Heidenhains Eisenhämatoxylin mit Orangenachfärbung (Orange G) ratsam. Für Kernfärbungen behandelten Schuberg und Schröder die Cysten 2—3 Tage bei 56^0 C mit Boraxkarmin vor, betteten die Objekte ein und färbten die 3—5 μ dicken Schnitte mit Methylenblau oder Methylgrün nach. Schöne Färbungen erhielten sie bei Boraxkarminvorfärbung und Anwendung der von Blochmann modifizierten van Gieson'schen Färbung.

„Benutzt wurde eine 0,01 proz. Lösung von triphenylrosanilintrisulphosaurem Natrium in gesättigter, wässeriger Pikrinsäurelösung. Hierin wurden die Schnitte bis zu 12 Stunden belassen. Die Schale der Sporen färbte sich gelb, Sporoplasma und Polkapseln grün bei roter Kernfärbung“ (Archiv f. Protistenkunde 6. Bd., 1905).

Die Färbung kann man eventuell ersparen, wenn man das nach Flemming oder Herrmann fixierte Material direkt in rohen Holzessig oder in eine schwache Lösung von Pyrogallussäure bringt.

Für Infektionsversuche wird das Sporenmaterial, in

Filtrierpapier eingewickelt, mit einer Schnur befestigt und einem Fisch zum Verschlucken gegeben. Vergleiche auch die Ausführungen von Thélohan. Für Infektionsversuche mit Pebrine genügt es, das Sporenmaterial mit einem Pinsel an frische Maulbeerblätter aufzutragen und diese nach dem Abtrocknen an junge Seidenraupen zu verfüttern.

5. Ordnung. Sarkosporidien.

Die sogen. Sarkosporidiensporen werden am besten im Gewebssaft, in physiologischer Kochsalzlösung, in Eiweißlösung (Eiweiß 20, 1 g Kochsalz, Aqua dest. 180) oder im filtrierten menschlichen Speichel untersucht (heizbarer Objekttisch).

Die trockenen Ausstriche der Sporen färbt man nach einer Fixierung mit Alkohol absolut (15 Miuuten) nach der Methode von Giemsa oder mit Methylenviolett, Gentiana und Fuchsin (Kitt).

Bei sarkosporidienkranken Tieren sind Blutuntersuchungen angezeigt, da nach van Eecke die „Sporen", die neben dem Kern oft noch ein chromatisches Korn und eine Vakuole besitzen, „zu jeder Zeit bestehende Eigenbewegungen, welche zum Teil fortschreitende, andernteils rotierende und außerdem auch örtliche sind", ausführen. Es ist daher die Annahme nicht unberechtigt, daß diese Entwicklungsstadien in die Blutbahn übertreten und von da durch blutsaugende Insekten weiter verschleppt werden.

Infizierte Muskeln werden mit Sublimatalkohol ($^2/_3$ konz. wässerige Sublimatlösung + $^1/_3$ Alkohol absolut), mit Flemming's Gemisch (1proz. Chromsäure 15 Teile, 2proz. Osmiumsäure 4 Teile, Eisessig 1 Teil), Hermann's Gemisch (15 Teile 1proz. Platinchloridlösung, 1 Teil Eisessig, 4 Teile 2proz. Osmiumsäure) fixiert. Bei verkalkten Muskelschläuchen ist eine Konservierung mit dem Gemisch von Perényi, das sonst

nicht besonders zu empfehlen ist, angezeigt (4 Teile 10proz. Salpetersäure, 3 Teile 90proz. Alkohol, drei Teile $^1/_2$proz. Chromsäurelösung).

Rieck härtet die Schläuche mit Alkohol oder mit Müllerscher Flüssigkeit: Kaliumbichromat 2—$2^1/_2$ g, Natriumsulfat 1 g, Wasser 100 ccm, Fixierung 1—2 Tage, gut auswaschen in Wasser, Alkoholreihe etc., färbt mit Hämatoxylin und dann mit Eosin nach und hellt die Schnitte in pikrinsäurehaltigem Nelkenöl auf. Nicolle färbt mit Karbolthionin: 100 g 1proz. Karbolwasser, 10 ccm gesättigte Lösung von Thionin in 5proz. Alkohol.

II. Stamm. Ciliophora.

Klasse Ciliata.

Infusorien kann man sich in größerer Menge durch das Anlegen von Infusionen aus Heu, Stroh, Pferdemist, Pflanzenblättern usw. beschaffen. Sogen. Paramaecienkulturen werden nach den Angaben von R. Hertwig in folgender Weise gewonnen: Teilstücke der Kiemen und des Fußes der Teichmuschel (Anodonta) werden ins Wasser gelegt, worauf sich nach einigen Tagen Paramäcien oben am Wasserrande ansammeln. Diese sammelt man mittels einer gut gereinigten Pipette und überträgt sie in Zuchtgläser mit stark geschütteltem, altem, ausgefaultem Teichwasser, in das an einer Schnur ein Gazebeutelchen mit zerkleinerten Salatblättern hineingehängt wird. Bald entwickeln sich zahlreiche Fäulnisbakterien, die den Paramäcien zur Nahrung dienen. Die Salatblätter muß man öfters wechseln. Colpidien„kulturen“ gewinnt man aus Heuinfusionen, indem man hernach die Protisten in einen aufgekochten Blätteraufguß bringt.

Die Vermehrung der Infusorien geht in diesen Kulturen nicht ins Unbegrenzte, es tritt nach einiger Zeit eine Periode der Depression ein (R. Hertwig, Calkins, Kulagin, Statkewitsch u. a.). Die Depressionszustände werden durch Wechsel der Flüssigkeit, Bewegung (Calkins), Zusatz von Fleischextrakt, Temperaturänderungen usw. behoben. Statkewitsch (Archiv f. Protistenkunde 5. Bd., 1905) belebte die Kulturen durch sukzessive Durchspülungen, durch mechanisches Umrühren, durch allmähliche Neutralisation der Kulturen durch kohlensaures Natron und durch Zusatz von sehr geringen Quantitäten von phosphorsaurem Kalzium.

Für besondere Zwecke, wie für das Studium der Teilungsgeschwindigkeit, der Depression, des Alterns der Protozoen u. a. züchtet R. Hertwig die Infusorien (Dileptus, Stentor, Stylonychia- und Aktinosphärium) in kleinen Uhrschälchen mit ebenem Boden, die mittels Vaseline übereinander gut zugekittet werden und in die je ein Infusor, das mit einer sehr feinen Kapillarpipette herausgefangen wurde, hineingebracht wird.

Um die Geschwindigkeit der Ortsveränderungen der Ciliaten herabzusetzen bedient man sich nach dem Vorschlag von E. Stahl und Jensen der Gelatine.

K. Ludolff setzte einigen Tropfen der Infusorienflüssigkeit zu diesem Zwecke etwas von 3proz. Gelatinelösung hinzu. Die Gelatine muß aber vorher erwärmt werden, auch kann man eine gleichmäßige Mischung beider Medien nur schwer erzielen. Statkewitsch züchtete daher die Infusorien direkt in schleimig-kolloidalen Medien (Medium syrupoidale et colloidale), wobei die Bewegungstätigkeit der fraglichen Mikroorganismen herabgesetzt worden ist. Auf den Boden eines breiten Probiergläschens streut man zu diesem Zwecke Semen Psyllii 1—2 cm hoch und gießt darüber 5—8—10 ccm Kulturflüssigkeit mit den Protisten auf.

Unter den verschiedensten Versuchsbedingungen ist aber Alga caragaheen als Zusatz besonders geeignet. Alga Caragaheen wird in reinen, weichen Marlensäckchen in die Kulturflüssigkeit hineingehängt, worauf die schleimige Substanz in das Wasser hineindiffundiert.

Das Untersuchungsmedium erhält ferner durch Zusatz von Semen Cydoniae und Gummi Tragacanthae nach einiger Zeit eine ziemlich steife Konsistenz. Weniger geeignet ist Gummi cerasi und Gummi arabicum.

Schließlich ist hier Agar-Agar (Tjien-Tjien) zu erwähnen. Es werden davon 3—7 g in Stangen von 8 bis 10 cm Länge zerkleinert, worauf darüber ein Aufguß von 100—200 ccm Wasser, dem kohlensaures Natron oder phosphorsaures Kalzium hinzugefügt worden ist, kommt.

Für das Studium der Art der Wimperbewegung eignen sich Suspensionen von Tusche, Indigokarmin (Ehrenberg), Kohle, Lycopodium usw. Durch die Methode der Vitalfärbung (Neutralrot, Methylenblau, Brillantkresylblau) kann zunächst die Art und der Verlauf der Verdauung untersucht werden (mit Neutralrot sauerkirschrot, alkalisch-gelbrot, ferner kann in manchen Fällen eine Tinktion des Kernes erzielt werden, außerdem färben sich verschiedene Granulationen (Fermentträger, Nierenstein) mit Neutralrot, weniger gut mit Methylenblau. Schließlich kann durch das Neutralrot der Grad der Vitalität der verschiedenen Organoide der Zelle sowie das Eintreten des Zelltodes festgestellt werden, indem sich die gefärbten Einschlüsse bei den postmortalen Reduktionen entfärben.

Für die Feststellung der Reaktionen bei der Verdauung ist auch Lackmuspulver und Kongorot geeignet.

Einzelne Infusorien fixiert man unter dem Deckglas, indem man rasch die Fixierungsflüssigkeit von der einen Seite des Präparates hinzutreten läßt und

gleichzeitig von der anderen Seite mit Wollfäden oder Fließpapierstreifen absaugt. Es ist jedoch darauf zu achten, daß bei allen diesen Manipulationen das Objekt nicht trocken wird. Steht eine größere Menge von Ciliaten zur Verfügung, so bedient man sich der sogen. Massenmethode, indem man die Protisten in einem Zentrifugenröhrchen konserviert, auswäscht und färbt.

Die Ciliaten werden mit folgenden Konservierungsflüssigkeiten fixiert:

1. Konzentrierte Pikrinsäure (Pfitzner) oder Pikrinessigsäure (Thon) (3 Teile Pikrinsäure + 1 Teil Eisessig). Fixieren 12—20 Stunden. Auswaschen im 70proz. Alkohol.

2. 1proz. Osmiumsäure wird zu dem Infusionswasser zugesetzt (Korschelt). Certes fixiert mit 2proz. Osmiumsäure.

3. Einige Minuten langes Fixieren mit einer $^1/_3$proz. wässerigen Chlorpalladiumlösung (Cattaneo, Journ. R. Micr. Soc., London 1885, p. 538).

4. Lo Bianco konserviert Vorticellen mit heißer Sublimatlösung, Acineten mit Sublimat im Seewasser oder mit Osmiumsäure.

5. Fabre-Domerque fixiert mit einer konzentrierten Lösung von Osmiumsäure, bettet in Paraffin ein und schneidet jedesmal ein einziges, mit Pikrokarmin vorgefärbtes Tier.

6. Balbiani fixiert Loxophyllum mit $^1/_2$—1proz. Osmiumsäure, färbt mit Methylgrün und Eisessigsäure, fügt unter dem Deckglas 1—2 Tropfen Ammoniak auf 20 ccm Wasser hinzu und wäscht es mit in Wasser gelöstem Methylgrün aus.

7. Hoyer fixiert Colpidium mit 1 Teil 5proz. Sublimatlösung und 2 Teilen 3proz. Kaliumbichromatlösung eine Stunde lang.

8. Stylonychia kann man mit Perényischer Flüssigkeit (4 Teile 10proz. Salpetersäure, 3 Teile 90proz. Alkohol und 3 Teile 1/2proz. Chromsäurelösung) fixieren, wobei sich die krystallinischen Einlagerungen lösen.

9. Viele Infusorien fixiert man mit Vorteil mit dem Gemisch vom Rath (Anat. Anzeiger 11. Bd., 1895, S. 289): 100 ccm gesättigte Lösung von Pikrinsäure, 6 ccm 2proz. Osmiumsäure, 1 ccm Eisessig (Auswaschen in Alkohol) oder mit Sublimatalkohol (2/3 konz. wässeriges Sublimat + 1/3 90proz. Alkohol) oder mit Flemmings Gemisch (1proz. Chromsäure 15 Teile, 2proz. Osmiumsäure 4 Teile, Eisessig 1 Teil).

Die Infusorien werden nach der S. 22 angegebenen Methode in Paraffin eingebettet und geschnitten.

Die Schnitte färbt man mit Heidenhains Eisenhämatoxylin (S. 22) mit Bordeauxrot- oder Rubin S.-Nachfärbung oder nach Thon (Arch. f. Protistenkunde 5. Bd., 1905) mit der Malloryschen Methode. Die Methode ist aber etwas launenhaft und wenig dauerhaft. Die Nukleolarsubstanzen werden gelb, orange oder rot gefärbt. In den einzelnen Farbmischungen bleiben die Schnitte etwa 2 Minuten. Die Phosphormolybdänsäure muß gut ausgewaschen werden.

Gonder färbte die in Cephalopoden schmarotzenden Infusorien (Arch. f. Protistenkunde 5. Bd., 1905), die mit Osmiumdampf, Hermannscher, Flemmingscher Lösung oder Sublimatalkohol (2/3 konz. Sublimatlösung + 1/3 absolutem oder 70proz. Alkohol) fixiert wurden, mit Boraxkarmin (Grüblersche Tabletten, die in 1/2 Teil Wasser (heiß) und in 1/2 Teil 50proz. Alkohol, gelöst wurden), ferner mit Pikrokarmin und Mayers Hämalaun oder Delafields Hämatoxylin. Die Objekte werden in eine stark verdünnte Lösung über 24—48 Stunden gebracht, rasch mit salzsaurem Alkohol differenziert, mit Brunnenwasser ausgewaschen, Alkoholreihe, Nelkenöl, Kanadabalsam. —

Auch werden Infusorien einzeln isoliert und in Zedernöl oder Nelkenöl untersucht. Die genannten Öle hellen sie schön auf und man kann sie unter dem mit einem feinen Haar gestützten Deckgläschen von allen Seiten untersuchen.

Totopräparate von Infusorien werden auch mit Bealeschen Ammoniakkarmin und Alaunkarmin, das kaum überfärbt, gefärbt.

Zur Darstellung der Cilien werden verschiedene Methoden angegeben. Fol fixierte Tintinnen mit Eisenchlorid (in Alkohol von 60 Proz. verdünnt mit Wasser auf etwa 2 Proz.), wusch zunächst mit neutralem, dann um das Eisensalz hinwegzuschaffen, mit angesäuertem 70proz. Alkohol aus, und färbte mit Gerbsäure. Zur Darstellung der Wimperapparate färbte Maier (Archiv f. Protistenk. 03) nach Konservierung in kaltem Sublimatalkohol mit Heidenhains Eisenhämatoxylin, Vorfärbung in Bordeauxrot-R.

A. Schuberg (Arch. f. Protistenkunde 6. Bd., 1905) bringt zu dem gleichen Zwecke die Infusorien in einem kleinen Tropfen in ein größeres Uhrschälchen und übergießt sie mit einer Mischung von 5 Teilen 2proz. Kaliumbichromatlösung und 1 Teil 1proz. Osmiumsäure. Das Gemisch wird ordentlich durch mehrmaliges Aufsaugen mittels einer Pipette mit Gummihütchen durchgemischt, dann kommen die Infusorien mit wenig Flüssigkeit in eine verdünnte Silbernitratlösung und schließlich in eine 1proz. Silbernitratlösung, wo sie wiederum mit der Pipette durchgewirbelt werden. Dann werden die Protisten in einer größeren Menge destillierten Wassers gewaschen und durch die Alkoholreihe in Nelkenöl übertragen. Durch Klopfen auf das Deckgläschen werden einzelne Teile abgesprengt und auf die Insertion der Cilien usw. untersucht.

Auch können die Cilien nach der Methode von Löffler (S. 27) dargestellt werden. Als Beize nimmt

man Tannin-Eisenalaun-Wollschwarz, ein Gemisch, das unter dem Namen Löfflers Geißelbeize käuflich ist, und färbt mit Anilinwasser-Fuchsin nach, nur daß man im Gegensatz zu der bakteriologischen Methode die ganze Färbung stets auf nassem Wege ausführt und ein Erhitzen der Beize sowie der Färbeflüssigkeit übergeht, dafür aber beide mindestens eine halbe Stunde einwirken läßt. Nach der Alkoholreihe wird in diesem Falle zum Aufhellen statt Nelkenöl Xylol genommen.

Register.

Dönitz, Prof. Dr. **W., Die wirtschaftlich wichtigen Zecken mit bes. Berücksichtigung Afrikas.** Etwa 100 S. mit 38 Abb. auf 6 Taf. 1907.
Etwa M. 4.—, geb. M. 5.—

Sander, Marinestabsarzt a. D., **Dr. L., Die Tsetsen** (Glossinae Wiedemann). II, 77 Seiten mit einer Tafel und 25 Abbildungen. 1905. Mk. 2.40

Die in Afrika vorkommende Fliege, Tsetse genannt, gilt schon lange als Überträgerin verschiedener seuchenhafter Säugetier-Krankheiten. In der vorstehenden Arbeit, die zuerst im „Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene" erschienen ist, werden die offenstehenden Fragen geklärt und die Lebensweise etc. der Fliegen erörtert. Viele schöne, zum Teil selbstgezeichnete Abbildungen dienen zur Erläuterung.

Wasielewski, Stabsarzt Dr. **von, Studien und Mikrophotogramme zur Kenntnis der pathogenen Protozoen.**

1. Heft: **Untersuchungen über den Bau, die Entwicklung und über die pathogene Bedeutung der Coccidien.** V, 96 S. mit 27 Abb. u. 7 Lichtdrucktafeln (62 Mikrophotogr.). 1904. M. 6.—

Mayer, Oberarzt Dr. **Georg, Hygienische Studien in China.** VIII, 167 Seiten mit Abbildungen, 4 Tafeln u. 2 Karten. 1904. M. 5.—

Blätter für Volksgesundheitspflege: Das vorliegende Buch ist eine überaus zeitgemäße Arbeit, welche in verschiedenen Abschnitten nicht nur für den Hygieniker, sondern auch für den Reisenden von Interesse sein wird. Scharfe Beobachtung, objektives Urteil und großer Fleiß, der unter den schwierigen Verhältnissen doppelt anerkannt werden muß, zeichnen das Buch aus und geben ihm eine grundlegende Bedeutung besonders für viele Fragen der öffentlichen Gesundheitspflege und der Wasserbeurteilung in den untersuchten Gegenden.

Dieudonné, Prof. Dr. **A., Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie.** Zusammenfassende Übersicht über die Immunitätslehre. 4. umgearbeitete Aufl. gr. 8⁰. VI u. 210 S. 1905. M. 6.—, geb. M. 7.—

Hygienische Rundschau: In vier Abschnitten bespricht das Buch die natürliche Resistenz (angeborene Immunität), die natürlich erworbene Immunität, die künstlich erworbene Immunität (Schutzimpfung) und die Blutserumtherapie. Die weitere Gliederung der vier Kapitel ist übersichtlich und klar. Die Auswahl der abgehandelten Materien ist eine durchweg glückliche. Wichtiges ist nirgend übersehen worden. Die Darstellung ist bündig und überall, trotz der großen Kompliziertheit der Verhältnisse, leicht verständlich. Seinen Zweck, einen den Fragen der Immunität ferner stehenden Leser schnell mit allem Wichtigen und Wissenswerten über dieselben bekannt zu machen, erfüllt das Werk in vollkommenster Weise.